

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**PNÖMONİLİ SIĞIR AKCİĞERLERİNDEN
MYCOPLASMA'LARIN İZOLASYONU VE 16S RDNA PCR
VE DGGE İLE İDENTİFİKASYONU**

MEHMET ALİ TÜRKYILMAZ

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. A. FUNDA BAĞCIGİL**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Programında Mehmet Ali TÜRKYILMAZ tarafından hazırlanan Pnomonili
Sığır Akciğerlerinden Mycoplasma'ların İzolasyonu ve 16S rDNA PCR ve DGGE İle
İdentifikasyonu başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı
bulunarak kabul edilmiştir.

17 / 10 / 2014

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof. Dr. Seyyal AK (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)

2.Prof. Dr. Mihriban ÜLGEN (Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)

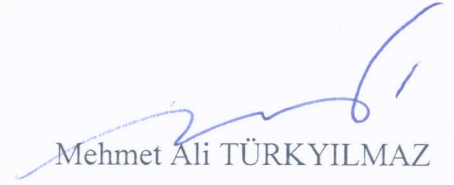
3.Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ (İ.Ü. Vetereiner Fakültesi İç Hastalıkları Abd.)

4.Doç. Dr. Serkan İKİZ (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)

5.Doç. Dr. A. Funda BAĞCIGİL (İ.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Abd.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Mehmet Ali TÜRKYILMAZ

İTHAF

Bu tez çalışmamı meslek büyüklerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Veteriner Mikrobiyolojinin duayenlerinden Sayın Hocam Prof. Dr. Atilla ILGAZ'a, doktora çalışmam süresince çok değerli desteklerinden dolayı Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. A. Funda BAĞCIGİL' e, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Seyyal AK'a, Anabilim Dalımızın tecrübeli Hocaları Sayın Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR ve Sayın Doç. Dr. Serkan İKİZ'e, yardımlarından dolayı Dr. Kemal METİNER, Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN, Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ, Dr. Baran ÇELİK ve Gülten KARAKUZ'a teşekkür ederim. İstatistiksel hesaplamalardaki değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Bülent EKİZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca, yetişmemde ve tez çalışmamda büyük emeği bulunan Sayın Dr. Ümit ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: TAGEM/HSYGAD/12/A02/P02/03.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Mollicutes</i> Sınıfı.....	4
2.2. <i>Mycoplasma</i> Cinsi.....	7
2.3. Bulaşıcı Sığır Plöropnömonisi	11
2.4. Sığırların <i>Mycoplasma bovis</i> Pnömonisi	20
2.5. Sığır Solunum Sisteminden İzole Edilen Diğer Mikoplazmalar.....	26
2.6. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Örnekler	29
3.1.2. Kültür	29
3.1.2.1. Besiyerlerinde Kullanılan Stok Solüsyonlar	29
3.1.2.2. Besiyerleri	31
3.1.3. Standart Suşlar	33
3.1.4. Moleküler Çalışmalar.....	33
3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu	33
3.1.4.2. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi.....	33
3.1.4.3. <i>M. bovis</i> Spesifik PCR	34
3.1.5. Diğer Gereçler.....	34

3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Kültür	35
3.2.2. Moleküler Çalışmalar.....	36
3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	36
3.2.2.2. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi ile İdentifikasyon.....	37
3.2.2.3. <i>M. bovis</i> Spesifik PCR	38
3.2.3. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Kültür	40
4.2. Moleküler Çalışmalar.....	41
4.2.1. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi	41
4.2.2. <i>M. bovis</i> Spesifik PCR	45
4.3. İstatistiksel Analiz.....	45
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	53
ETİK KURUL KARARI	64
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>Mollicutes</i> sınıfının taksonomisi	7
Tablo 2-2: Sığırlardan izole edilen önemli <i>Mollicutes</i> türleri.....	11
Tablo 2-3: Sığır solunum sisteminden izole edilen mikoplazmaların biyokimyasal özellikleri	18
Tablo 3-1: Örneklerin alındığı hayvanlarla ilgili bilgiler	30
Tablo 4-1: Laboratuvara gelen örneklerden yapılan izolasyonların cinsiyete, yaşa ve hayvanın geldiği ile göre dağılımı	43
Tablo 4-2: Mezbahadan alınan örneklerden yapılan izolasyonların cinsiyete, yaşa ve hayvanın geldiği ile göre dağılımı	44
Tablo 4-3: Saptanan türlerin sayıları ve tüm izolatlara oranları	44
Tablo 4-4: Türlerin pnömonili akciğerlerde bulunma oranları	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Katı kültürde mikoplazma şüpheli koloniler.....	41
Şekil 4-2: Sıvı kültürler.....	41
Şekil 4-3: 16S rDNA PCR.....	41
Şekil 4-4: PCR/DGGE	42
Şekil 4-5: <i>M. bovis</i> spesifik PCR.....	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

€	Avro
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bp	Baz çifti
BRD	Sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi
CARDS	Community-acquired respiratory distress syndrome
CBPP	Bulaşıcı sığır plöropnömonisi
cELISA	Competitive enzyme-linked immunosorbent assay
CFT	Komplement fikzasyon testi
CFU	Koloni oluşturan birim
DGGE	Denatüre edici gradient jel elektroforezi
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G+C	Guanin + sitozin
kbp	Kilo baz çifti
MAM	<i>M. arthritidis</i> mitogen
MF-dot	Dot immunobinding testi
<i>MmmSC</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC
NCTC	National Collection of Type Cultures
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	Ribozomal deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
TCA	Trikarboksilik asit
USD	Amerika Birleşik Devletleri Doları
v/v	Hacim/hacim

ÖZET

Türkyılmaz, M.A. (2014). Pnömonili Sığır Akciğerlerinden *Mycoplasma*'ların İzolasyonu ve 16S rDNA PCR ve DGGE ile İdentifikasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Sığırların solunum sistemi infeksiyonlarından 9 *Mycoplasma* türü izole edilmektedir. Bunlardan en önemlileri bulaşıcı sığır plöropnömonisine yol açan *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*) ile pnömoni, mastit, artrit ve otite neden olan *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*)'tir. Bu tez çalışmasında laboratuvara gönderilen pnömoni lezyonlu 137 sığır akciğeri ve mezbahada kesilen sığırlara ait pnömoni lezyonlu 63 akciğer örneği mikoplazmalar yönünden bakteriyolojik olarak incelendi. İzole edilen suşların 16S rDNA PCR/DGGE ile identifikasyonları yapıldı ve ayrıca *M. bovis* spesifik PCR ile incelendi. Laboratuvara gönderilen 137 akciğerin 100 (%72,99)'ünden ve mezbahadan toplanan 63 akciğerin 6 (%9,52)'sından *Mycoplasma/Acholeplasma* izole edildi. PCR/DGGE ile 100 adet *M. bovis*, 1 adet *M. arginini*, 1 adet *Acholeplasma laidlawii* ve karışık kültür halinde 4 adet *M. bovis* + *M. arginini* identifiye edilirken, *MmmSC* saptanmadı. PCR/DGGE sonuçları ile tamamen uyumlu şekilde, *M. bovis* spesifik PCR ile de toplam 106 izolatın 104 (%98,11) 'ünde *M. bovis* saptandı. Bu çalışma ile ülkemiz sığır popülasyonunda *M. bovis*' in yaygın olduğu ve sığır pnömonilerinde göz önünde bulundurulması gereken önemli bir etken ortaya konulmuştur. Ayrıca 106 izolatın tamamının identifikasyonu PCR/DGGE ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş, tekniğin *M. bovis* identifikasyonunda spesifite ve sensitivitesinin yüksek olduğu belirlenmiş ve PCR/DGGE'nin veteriner teşhis laboratuvarlarında sığır akciğerinden izole edilen mikoplazmaların hızlı ve doğru teşhisinde rutin kullanım için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Pnömoni, sığır, *Mycoplasma*, denatüre edici gradient jel elektroforezi, PCR

Bu çalışma, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: TAGEM/HSYGAD/12/A02/P02/03.

ABSTRACT

Türkyılmaz, M.A. (2014). Isolation and Identification of Mycoplasmas From Pneumonic Lungs of Cattle by 16S rDNA PCR and DGGE. İstanbul University, Institute of Health Science, Microbiology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Nine species of *Mycoplasma* are isolated from respiratory tracts of cattle. Among them *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia, and *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), the cause of pneumonia, mastitis, arthritis and otitis, are the most significant. In the present study 137 pneumonic lungs of cattle submitted to laboratory and 63 pneumonic lungs of cattle from slaughterhouse were cultivated for mycoplasma. The strains isolated were identified by 16S rDNA PCR/DGGE and also tested by *M. bovis* specific PCR. *Mycoplasma/Acholeplasma* were isolated from 100 (%72.99) of clinical samples and 6 (%9.52) of slaughterhouse samples. One hundred *M. bovis*, 1 *M. arginini*, 1 *Acholeplasma laidlawii* and 4 *M. bovis* + *M. arginini* as mixed culture were identified by PCR/DGGE. *MmmSC* was not detected. By specific PCR, 104 of 106 (%98.11) isolates were identified as *M. bovis*, in full agreement with PCR/DGGE. This study showed that *M. bovis* was widespread in cattle in Turkey and should be considered in cattle pneumonia. PCR/DGGE technique was successful in identifying all 106 isolates and showed high specificity and sensitivity in *M. bovis* differentiation. In conclusion PCR/DGGE is a useful tool for rapid identification of mycoplasmas isolated from cattle lungs in veterinary diagnostic laboratories.

Key Words: Pneumonia, cattle, *Mycoplasma*, denaturing gradient gel electrophoresis, PCR

The present work was supported by the Research Fund of Ministry of Food, Agriculture and Livestock, General Directorate of Agricultural Research and Policies. Project No. TAGEM/HSYGAD/12/A02/P02/03

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikoplazmalar hücre duvarı olmayan, bu nedenle ileri derecede pleomorfik bireysel morfolojiye sahip ve hücre duvar sentezini inhibe eden antibiyotiklere dirençli çok küçük prokaryotlardır. Çeşitli *Mycoplasma* türleri insan, ruminantlar, domuz, kanatlılar ve yabani hayvanlarda önemli hastalıklara sebep olur. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütünün (OIE) 2014 yılı bildirim zorunlu hayvan hastalıkları listesinde 5 mikoplazma hastalığı ve bunlara yol açan 8 *Mycoplasma* türü bulunmaktadır. Bunlardan sığır patojeni olan iki tür *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (*MmmSC*) ve *Mycoplasma (M.) bovis*'tir.

Mikoplazmaların neden olduğu hastalıklar sığırların en önemli ve en fazla ekonomik öneme sahip hastalıklarındandır. Bunlardan biri sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksi (BRD) kapsamında değerlendirilen mikoplazma infeksiyonlarıdır. *M. bovis* çok önemli fakat gözden kaçan bir sığır patojeni olup buzağı pnömonisi, mastit, artrit ve diğer bazı hastalıklara yol açar ve BRD kapsamında yer alan mikoplazmaların en önemlisidir. Tümünün primer hastalık etkeni olduğu kanıtlanmamış olsa da; *M. bovis genitalium*, *M. bovirhinis*, *M. canis* ve *M. alkalescens* pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen diğer bazı *Mycoplasma* türleridir.

M. bovis infeksiyonu günümüzde bütün dünyada mevcuttur. Tüm Avrupa'da sığır pnömonileri nedeniyle yılda 576 milyon € kayıp olduğu açıklanmıştır. Bunun üçte birinin *M. bovis* nedeniyle meydana geldiği tahmin edilmektedir. ABD'de *M. bovis*'in solunum yolu infeksiyonlarının yıllık maliyetinin, sadece canlı ağırlık artışında ve karkas ağırlığındaki düşüş hesaplandığında 32 milyon USD olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde sığır pnömonilerinde *M. bovis*'in saptanması amacıyla az sayıda çalışma yapılmıştır ancak bunların tamımında etken çeşitli oranlarda tespit edilmiştir.

Sığırların bir diğer önemli mikoplazma hastalığı, *MmmSC*'nin neden olduğu bulaşıcı sığır plöroponömonisidir (CBPP). Yüksek derecede bulaşıcılığı ve neden olduğu büyük ekonomik kayıplar nedeniyle hem OIE hem de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının bildirim zorunlu hayvan hastalıkları listesinde yer almaktadır. Akut salgın durumunda morbidite %60'a, mortalite %50'ye ulaşır.

Avrupa kıtasında 1990'ların sonundan itibaren CBPP görülmemesine rağmen hastalık Afrika'nın halen büyük bir problemidir. Günümüzde Afrika'nın en fazla ekonomik öneme sahip sığır hastalığı ve şap hastalığı ile birlikte en önemli sınır aşırı hastalığıdır. Ayrıca geçmişte Orta Doğu ve çeşitli Asya ülkelerinden hastalık vakaları bildirilmiştir. Ülkemizde ise şimdiye kadar az sayıda çalışma yapılmış ancak hastalığın arilik durumu henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Bu tez çalışmasında *Mycoplasma* türlerinin tespiti amacıyla yararlanılan denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE) yöntemi teorik olarak DNA'daki tek baz mutasyonlarını tespit edebilecek hassasiyettedir. Metot, denatüre edici kimyasallarla birbirinden ayrılan komplementer DNA iplikçiklerinin jelde göçünün durması prensibine dayanır. Bantların jelde göçü DNA segmentinin denatürasyon davranışına göre şekillenir. Çift iplikçikli amplikonun, jelde göçü boyunca artan konsantrasyonda kimyasal denatüre ediciye (gradient) maruz kalması ve baz dizisi tarafından belirlenen bir noktada denatüre olmasıyla göç durur ve değişik bant profilleri oluşur. Yöntem, mikrobiyel ekolojide çeşitlilik analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ancak patojen mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanımı nispeten azdır ve yaklaşık on beş yıllık geçmişi vardır.

Mikoplazma infeksiyonlarının laboratuvar tanısı mevcut teşhis tekniklerindeki yetersizlikler nedeniyle göreceli olarak güçtür. Mikoplazmaların identifikasyonu için yeni uyarlanmış olan DGGE tekniğinin ise mevcut yöntemlere göre çeşitli avantajları mevcuttur. Karışık mikoplazma kültürlerinin klasik bakteriyolojik yöntemlerle tespit edilmesi, mikoplazma kolonilerinin türler arasında diğer bakterilerde olduğu gibi belirgin morfolojik farklılık göstermemesi ve identifikasyon için saf kültür elde etmek amacıyla genellikle tek bir koloninin seçilmesi nedeniyle zordur. Ayrıca nispeten hızlı üreyen tür diğerini baskılayabilmektedir. DGGE ise karışık kültürleri de tespit edebilme kabiliyetine sahiptir. Yöntemin diğer bir avantajı da daha önce sığırlarda tespit edilmemiş türler veya bilinmeyen *Mycoplasma* türlerinin tespit edebilme potansiyeline sahip olmasıdır.

Bu çalışma ile; mikoplazmaların ülkemizdeki sığır pnömonilerinde yaygınlığının araştırılması, BRD kapsamındaki *Mycoplasma* türlerinin pnömonili akciğerlerde bulunma oranının tespit edilmesi, mikroorganizma harici faktörlerin oldukça önemli olduğu bu infeksiyonlarda hayvanın geldiği bölge, yaş ve cinsiyet ile infeksiyon

arasındaki ilişkinin araştırılması, CBPP'nin ülkemizde varlığının araştırılması ve PCR/DGGE'nin *M. bovis* identifikasyonundaki spesifite ve sensitivitesinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Mollicutes* Sınıfı

Mikoplazmalar peptidoglikan sentezi yapamayan, dolayısıyla hücre duvarı olmayan çok küçük prokaryotlardır. *Mycoplasma* cinsi taksonomik olarak *Mollicutes* sınıfında yer alır (Krieg ve ark. 2010). Bu sınıfta bulunan türler çok küçük genomları, hücre duvarından yoksun oluşları, membran fonksiyonu ve üreme için kolesterole ihtiyaç duymaları, UGA kodonunu stop kodon yerine triptofan için kullanmaları, bakteri geçirmeyen filtrelerden geçebilmeleri, barınma ve beslenme ihtiyaçları için konaklarına sıkı sıkıya bağımlı oluşları nedeniyle kendi kendine çoğalan bakteriler arasında en alışılmadık grubu oluşturmaktadırlar (Baseman ve Tully 1997). Fenotipik ve genotipik çok sayıda özellik açısından hücre duvarlı bakterilerden önemli ölçüde farklılık göstermeleri nedeniyle *Tenericutes* adlı ayrı bir bölüm oluşturulmuş ve *Mollicutes* sınıfı bu bölüme taşınmıştır (Miles ve Nicholas 1998; Krieg ve ark. 2010). ‘Mikoplazmalar’ ifadesi *Mycoplasma* cinsine ait mikroorganizmaları tanımlamakta kullanıldığı gibi daha geniş anlamda tüm *Mollicutes* sınıfı üyelerini kastederek de kullanılmaktadır (Miles ve Nicholas 1998).

Mollicutes sınıfındaki mikroorganizmalar hücre duvarından yoksundur ve hücreyi yalnızca üç katlı plazma membranı sarar. Bu sayede esnek yapıdadırlar ve türlerin çoğu 450 nm por çaplı filtrelerden kolayca geçebilir. Bunun yanında bazı türlere ait küçük hücreler 100 nm por büyüklüğüne sahip filtreleri de geçebilmektedir. Hücre duvarı bulunmaması ayrıca ileri derecede pleomorfik bireysel morfolojiye sahip olmalarına neden olmaktadır. Yine aynı nedenle penisilin gibi hücre duvar sentez inhibitörü antibiyotiklere dirençli; ozmotik şok, alkoller ve yüzey aktif maddelere duyarlıdırlar (Krieg ve ark. 2010).

Mollicutes türleri kendi kendine çoğalma yeteneğine sahip en küçük mikroorganizmalardır (Miles ve Nicholas 1998). Kokoid şekilden branşlı filamentöz ve sarmal filamentöz şekle kadar birçok görünümde olabilirler. Hücreler bazen zincir oluşturabilir (Hirsh ve ark. 2004; Krieg ve ark. 2010). Kokoid şekilli olanlar çoğunlukla 200-400 nm çapındadır fakat 2000 nm boyutunda hücrelere de rastlanabilir. Gram negatif olarak kabul edilmelerine karşın genetik olarak Gram pozitif bakterilerle ilişkilidirler. Filogenetik ağaçta Gram pozitif bakteriler içinde, fakat ayrı bir soy

(lineage) olarak yer alırlar (Krieg ve ark. 2010). Gram boyama yöntemiyle iyi boyanmazlar, Giemsa veya Castaneda yöntemleri ile boyanmaları gerekir (Hirsh ve ark. 2004). Hücreler karanlık alan ve faz kontrast mikroskopunda incelenebilirler (Brown ve ark. 2007). İkiye bölünme ile çoğalırlar ve endospor oluşturmazlar. Bazı türler kapsüllüdür. Çoğu tür fakültatif anaerob olup az sayıda tür de aerob veya obligat anaerobtur. Bazı türler kayma hareketine, sarmal filamentöz morfolojiye sahip türler ise dönme ve kıvrılma hareketine sahiptir ancak çoğu tür hareketsizdir. Birkaç türde fimbria ve pilus bulunduğu bildirilmiştir (Krieg ve ark. 2010). Sıcaklığa, deterjanlara, kuruluğa ve genel olarak dezenfektanlara çok duyarlıdırlar (Hirsh ve ark. 2004; Quinn ve ark. 2011). Katı besiyerinde üreyen kolonilerin çapı genellikle 1 mm'den küçüktür. Üremekte olan koloniler besiyerinin içine doğru ilerleme eğilimindedir ve bu durum hemen hemen tüm türlerde gözlenen karakteristik sahanda yumurta görünümüne yol açar. Kültürü yapılabilen tüm türler hücre kültürüne gerek olmaksızın yapay besiyerlerinde üretilebilmektedir ancak sadece moleküler olarak karakterize edilip henüz kültürü yapılamamış türler de bulunmaktadır. Kültürü yapılabilen türlerden çoğu üremeleri için sterol ve yağ asitlerine ihtiyaç duyar (Krieg ve ark. 2010). Steroller sitoplazmik membranın yapısı ve fonksiyonunda görev almaktadır (Baseman ve Tully 1997).

Mikoplazmalar basit bir hücre yapısına sahiptirler. Başlıca üç yapıdan oluşur: sitoplazmik membran, ribozomlar ve diğer prokaryotlarda olduğu gibi bir adet sirküler çift iplikçikli DNA molekülü. Esnek yapılı plazma membranı nedeniyle türler en çok yuvarlak veya yuvarlağa yakın şekildedirler. Ancak uçta yer alan 'terminal organel' nedeniyle armut veya şişe benzeri görünüm de oldukça yaygındır. Bunun yanında branşlı veya branşsız çeşitli uzunluklarda filamentler veya sarmal filamentler şeklinde de bulunabilirler. Sert hücre duvarları bulunmamasına karşın mikoplazmaların şekillerini koruyabilmeleri türlerin bir kısmında bulunan hücre iskeleti sayesinde olmaktadır. (Falkow ve ark. 2006).

Mollicutes türleri genetik olarak küçük genomları ve oldukça düşük G+C oranları ile karakterizedir. Sahip oldukları 580 - 2200 kbp arası genom boyutları ile prokaryotlar arasında en küçük genomlu mikroorganizma grubunu oluştururlar. DNA G+C içerikleri genellikle %23-34 arasındadır. Diğer bakterilerden yalnızca bir veya iki rRNA operonu taşımalarıyla ayrılırlar (istisna olarak bir Mesoplasma türünde üçtür).

Göze çarpan bir başka özellik, bakterilerde genellikle stop kodon olarak kullanılan UGA kodonunun çoğu *Mollicutes* türünde triptofan için kullanılmasıdır. Plazmidler ve bakteriyofajlar bazı türlerde gözlenmektedir (Krieg ve ark. 2010).

Mollicutes türleri, kısıtlı genetik materyalleri yüzünden, hem enerji üretimi hem de hücre komponentlerinin sentezi ile ilgili bakterilerde karakteristik olan birçok enzimatik yoldan yoksundur. Bunlar arasında murein ve nükleotid sentezi, fonksiyonel trikarboksilik asit (TCA) siklusu ve sitokrom aracılı elektron transport zinciri sayılabilir. Bunların sonuçları; hücre duvarına sahip olmamaları, besiyerlerinde DNA yapıtaşlarına ihtiyaç duymaları ve verimsiz enerji üretim yollarına sahip olmalarıdır. Kompleks besin maddeleri ihtiyaçlarını karşılayabilmek için ise çok miktarda degradasyon enzimleri (nükleaz ve proteazlar) üretirler (Dybvig ve Voelker 1996).

Mollicutes sınıfını oluşturan 200'den fazla tür insan, omurgalılar, artropodlar ve bitkiler gibi oldukça geniş bir konak yelpazesinde kommensal ya da paraziter yaşam sürer. Çok sayıda tür hayvanlar, artropodlar ve bitkiler için önemli patojenlerdir (Krieg ve ark. 2010). İnsan ve hayvan mikoplazmalarının başlıca yaşam ortamları; solunum yolları, ürogenital sistem, sindirim kanalı, göz, meme ve eklemlerin muköz ve seröz yüzeyleridir (Falkow ve ark. 2006). *Mollicutes* sınıfının en son taksonomisi Tablo 2-1'de verilmiştir (Krieg ve ark. 2010).

Tablo 2-1: *Mollicutes* sınıfının taksonomisi

Bölüm: <i>Tenericutes</i>
Sınıf 1: <i>Mollicutes</i>
Takım 1: <i>Mycoplasmatales</i>
Aile 1: <i>Mycoplasmataceae</i>
Cins 1: <i>Mycoplasma</i>
Cins 2: <i>Ureaplasma</i>
Aile 2: <i>Incertae sedis</i>
Cins 1: <i>Eperythrozoon</i>
Cins 2: <i>Haemobartonella</i>
Takım 2: <i>Entomoplasmatales</i>
Aile 1: <i>Entomoplasmataceae</i>
Cins 1: <i>Entomoplasma</i>
Cins 2: <i>Mesoplasma</i>
Aile 2: <i>Spiroplasmataceae</i>
Cins 1: <i>Spiroplasma</i>
Takım 3: <i>Acholeplasmatales</i>
Aile 1: <i>Acholeplasmataceae</i>
Cins 1: <i>Acholeplasma</i>
Aile 2: <i>Incertae sedis</i>
Cins 1: “ <i>Candidatus Phytoplasma</i> ”
Takım 4: <i>Anaeroplasmatales</i>
Aile 1: <i>Anaeroplasmataceae</i>
Cins 1: <i>Anaeroplasma</i>
Cins 2: <i>Asteroleplasma</i>

2.2. *Mycoplasma* Cinsi

Mycoplasma cinsi nükleotid sekans verilerine göre ‘hominis grubu’, ‘pneumoniae grubu’ ve ‘*mycoides* cluster’ olarak üçe ayrılmaktadır ve 100’ün üzerinde türü içermektedir (Krieg ve ark. 2010).

Mycoplasma türlerinin en küçük genoma sahip prokaryotlar olmaları, bekleneceği üzere en nazlı üreyen mikroorganizmalar olmalarına neden olmaktadır

(Krieg ve ark. 2010). Bu durum mikoplazma etkenlerin klinik örneklerden izolasyonunu ve yeni türlerin açığa çıkarılmasını zorlaştırmaktadır (Nicholas ve ark. 2008). Günümüzde bilinenden çok daha fazla mikoplazmanın bulunduğu düşünülmektedir (Nicholas ve ark. 2008). *Mycoplasma* türleri, minimalist genomları ve buna bağlı şekillenen düşük metabolik kapasiteleri yüzünden omurgalı konaklarıyla kommensal veya paraziter olarak sıkı ilişki içinde olmak zorundadırlar. Esansiyel yağ asitleri, lipid prekürsörleri, nükelik asit prekürsörleri, steroller, amino asitler ve vitaminleri konaktan sağlarlar (Nicholas ve ark. 2008; Baseman ve Tully 1997). Geniş konak spektrumuna sahip türler de olmakla birlikte, konağa bağımlı olmanın bir sonucu olarak oldukça fazla konak spesifitesi gösterirler (Falkow ve ark. 2006). *Mycoplasma* türlerinin kısıtlı genetik materyal ve metabolizması ayrıca konvansiyonel biyokimyasal testler ile identifikasyonlarını kısıtlamakta, in vitro üretilmeleri için kompleks bileşimli ve mikoplazmalara özel besiyerlerini zorunlu kılmaktadır (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

Mycoplasma türleri laboratuvarında üretilmeleri için sterollere gereksinim duyarlar ve başlıca enerji kaynağı olarak şekerleri ve/veya arjinini kullanırlar (Krieg ve ark. 2010). Besiyeri formülasyonları, mikoplazma üretme faktörleri olarak kan serumu, maya ekstraktı ve arjinin, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı, diğer bakterilerin inhibisyonu için de hücre duvar sentez inhibitörü antibiyotikleri içerir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010). Ancak bazı türler günümüzde mevcut en iyi besiyerlerinde bile çok zayıf üremektedir (Nicholas ve ark. 2008). İdeal üreme sıcaklıkları 37°C'dir. Kolonileri tipik sahanda yumurta görünümündedir, çapı genellikle 1 mm'den küçüktür (Krieg ve ark. 2010) ve mikroskopta incelenmeleri gerekir (35× büyütme) (Miles ve Nicholas 1998). Sıvı besiyerinde hafif bulanıklık ve dipte az miktarda sediment oluşturarak ürerler. İstisna olarak *Mycoplasma mycoides* cluster üyeleri belirgin bulanıklık ve sediment meydana getirir (Krieg ve ark. 2010).

Mikoplazmalar insan, evcil hayvanlar, balıklar, sürüngenler, kuşlar ile diğer kara ve su hayvanlarında patojen veya apatojen yaşam sürerler. Bazıları insan, ruminantlar, domuz, kanatlılar ve yabani hayvanlarda önemli hastalıklara sebep olurken, bazıları da bu konaklarda fırsatçı veya sekonder patojendir. Sığır patojeni en önemli iki tür *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony (SC) ve *Mycoplasma bovis*'tir (Krieg ve ark. 2010).

İnsan ve hayvanlarda, floranın bir parçası olan ya da parazitik karakterde olan *Mycoplasma* türlerinin, müköz ve seröz epitel yüzeylere afiniteleri vardır (Falkow ve ark. 2006). Patojen türler oldukça karmaşık virülens faktörlerine sahiptir. Bunlar arasında adezinler, hücre dışı polisakkarit yapılar, yangı veya apoptozisi indükleyen membran lipoproteinleri, hücre dışı endopeptidaz, nükleaz ve glikozidazlar yer alır. Ayrıca hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve amonyak gibi ara metabolizma yan ürünleri patogeneze önemlidir. Bunların dışında bazı muhtemel virülens mekanizmaları da söz konusudur; (a) bağışıklık hücreleri, bunların reseptörleri veya sitokinlerin supresyonu veya patolojik stimülasyonu, (b) hareket, (c) biyofilm oluşumu, (d) değişken yüzey antijenleri ve (e) hücre içi parazitizm (Krieg ve ark. 2010). Genel özellik olarak ekstraselüler karakterde olup, epitelyal yüzeylerde kolonize olsalar da, bazı türlerin (örneğin *Mycoplasma gallisepticum*) in vitro ve in vivo olarak ökaryotik hücre invazyonu yapabildiği bilinmektedir (Razin ve Herrmann 2002; Lam 2005; Vogl ve ark. 2008). Patojen mikoplazmalar hidrojen peroksit gibi orta derecede toksik metabolizma yan ürünleri üretseler de diğer patojen bakterilerde olduğu gibi spesifik ekzotoksinler tespit edilememiştir (Falkow ve ark. 2006). Ancak istisna olarak *M. pneumoniae*'nin 'community-acquired respiratory distress syndrome' (CARDS) adlı sitotoksini (Kannan ve Baseman 2006) ve *M. arthritidis*'in bir T-lenfosit mitojeni olan 'M. arthritidis mitogen' (MAM) adlı süperantijeni (Atkin ve ark. 1994) bulunmaktadır. Bütün bu virülens faktörleri yine de oluşan patolojik lezyonları açıklamakta yetersiz olmaktadır ki mikoplazma hastalıklarının moleküler patogenezi günümüzde büyük ölçüde aydınlatılamamıştır (Citti ve Blanchard 2013).

Hücre duvarı ve lipopolisakkaritten yoksun olmaları, ayrıca kendi nükleotidlerini sentezleyememeleri nedeniyle *Mycoplasma* türleri polimiksinler, beta-laktamlar, vankomisin, fosfomisin, sülfonamidler ve trimetoprim doğal dirençlidirler (intrinsik direnç). Ayrıca mikoplazma RNA polimerazları rifampine duyarlı olmadığından bu antibiyotik için de doğal direnç söz konusudur. Mikoplazma hastalıklarının tedavisinde protein sentezini veya DNA replikasyonunu inhibe eden antibiyotikler etkili olabilmektedir. Bunların arasından makrolidler, tetrakisinler, florokinolonlar, aminoglikozitler, pleuromutilinler ve fenikoller veteriner hekimliğinde kullanılmaktadır. Mikoplazmaların dokularda (sekestrasyon) ve potansiyel olarak hücre içinde (intraselüler parazitizm) gizlenme eğiliminden dolayı genellikle uzun süreli antibiyotik tedavisi zorunludur (Krieg ve ark. 2010).

Oluşturdukları çeşitli hastalıklar nedeniyle mikoplazmaların çalışıldığı başlıca alanlar veteriner ve beşeri hekimliktir (Miles ve Nicholas 1998). Bitki hastalıklarına yol açıp ekonomik kayıp oluşturmaları nedeniyle bitki koruma biliminde de çalışma konusudurlar (Miles ve Nicholas 1998). Veteriner hekimlik ve diğer biyomedikal bilimler için önemli bir başka yönleri, sık sık inatçı ve fark edilmesi zor hücre kültürü kontaminasyonlarına neden olmalarıdır (Krieg ve ark. 2010). Bazen infekte hücreler anormal üreme veya morfoloji sergilerken çoğu kez açık belirti bulunmaz (Baseman ve Tully 1997). Bu durum, hücre kültürleri araştırma amaçlı kullanıldığında çalışma sonuçlarının güvenilmez veya yanıltıcı olmasına, üretimde kullanıldığında ekzojen mikoplazmanın final biyolojik üründe istenmeden bulunmasına neden olur (Baseman ve Tully 1997). Farklı ülkelerde yapılan değişik çalışmalar hücre kültürlerinin %10-87'sinin mikoplazmalar ile kontamine olduğunu göstermiştir (Falkow ve ark. 2006). Mikoplazmaların bilinen en küçük genoma sahip prokaryotlar olmaları (*Mycoplasma genitalium* için 580 kbp) canlılarda nükleotid sekansları ile hücresel yapı ve fonksiyonlar arasındaki ilişkinin anlaşılması için çok uygun model organizmalar olmalarını sağlar (Miles ve Nicholas 1998).

Sığırlardan ve diğer evcil hayvanlardan çeşitli *Mycoplasma*, *Acholeplasma* *Ureaplasma* ve *Anaeroplasma* türleri izole edilmekte, fakat bunların çoğunun hastalık oluşturma durumları bilinmemektedir (Maniloff ve ark. 1992; Tully ve Razin 1996). Mikoplazmalar, en önemli ekonomik kayıpları, çiftlik hayvanları ve kanatlılarda oluşturmaktadır (Miles ve Nicholas 1998). Dünya Hayvan Sağlığı Örgütünün (OIE) 2014 yılı bildirimi zorunlu hayvan hastalıkları listesinde 5 mikoplazma hastalığı ve bunlara yol açan 8 *Mycoplasma* türü bulunmaktadır (OIE 2014). Evcil ruminantlarda ise bunlardan 3 hastalık ve 6 tür görülmekte, ayrıca bunlar dahil 30'dan fazla mikoplazma izole edilmektedir (Nicholas ve ark. 2008; OIE 2014). Sığırlardan izole edilen önemli *Mollicutes* türleri ve neden oldukları hastalıklar Tablo 2-2'de özetlenmiştir.

Tablo 2-2: Sığırlardan izole edilen önemli *Mollicutes* türleri

Tür	Hastalık
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Bulaşıcı sığır plöropnömonisi
<i>Mycoplasma bovis</i>	Pnömoni, mastitis, artritis, keratokonjunktivitis, otitis, abortus
<i>Mycoplasma canis</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma californicum</i>	Mastitis, pnömoni
<i>Mycoplasma bovigenitalium</i>	Endometritis, infertilite
<i>Mycoplasma alkalescens</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma canadense</i>	Mastitis, artritis, pnömoni
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma bovoculi</i>	Keratokonjunktivitis
<i>Mycoplasma alvi</i>	Bilinmiyor
<i>Mycoplasma verecundum</i>	Bilinmiyor
<i>Mycoplasma leachii</i>	Mastitis, artritis, pnömoni
<i>Mycoplasma dispar</i>	Pnömoni
<i>Mycoplasma arginini</i>	Apatojen
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Apatojen

2.3. Bulaşıcı Sığır Plöropnömonisi

Bulaşıcı sığır plöropnömonisi (CBPP) sığırların en önemli mikoplazma hastalığıdır ve *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*) tarafından oluşturulur (Provost ve ark. 1987). Hastalık hem OIE hem de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının bildirim zorunlu hayvan hastalıkları listesinde yer almaktadır. (GKGM 2013; OIE 2014). CBPP epidemiyolojik açıdan bulaşıcılığı ile ve klinik olarak ateş, iştahsızlık, öksürük, hızlı solunum, solunum güçlüğü ve burun akıntısı ile karakterizedir (Ter Laak 1992). Hastalığın duyarlı sürüye girişi değişik şiddette yanıt oluşturur. Akut salgın durumunda morbidite %60'a, mortalite %50'ye ulaşabilir (Andrews ve ark. 2004).

Hastalık etkeni *MmmSC*, *Mollicutes* sınıfının tip türüdür ve en virulent sığır mikoplazmasıdır (Hirsh ve ark. 2004; Krieg ve ark. 2010). *Mycoplasma* cinsinin genel özelliklerini taşır (Krieg ve ark. 2010). Mikroorganizma çevrede uzun süre canlı kalmaz. Yaygın kullanılan dezenfektanların çoğu ile kısa sürede inaktif olur. Düşük

ve yüksek pH'lı ortamlara duyarlıdır. Konak dışı ortamda tropikal bölgelerde 3 gün, ılıman bölgelerde 2 hafta canlı kalabilir (OIE 2013b).

MmmSC, *Mycoplasma* (*M.*) *mycoides* cluster üyesidir. *M. mycoides* cluster başlıca sığır ve keçi orijinli; serolojik, biyokimyasal ve genetik olarak yakın ilişkili 5 mikoplazmayı kapsamaktadır (Thiaucourt ve ark. 2000; Krieg ve ark. 2010). Bu durum standart tekniklerle teşhislerinde problem oluşturur. Geçmişte *MmmSC* suşlarının oldukça homojen olduğu düşünülmüştür. Ancak on yıl kadar önce geliştirilen 'multi-locus sequence analysis' yöntemiyle suşların coğrafi orijinleri ile uyumlu olarak 3 temel soya (lineage) ayrıldığı tespit edilmiştir (Lorenzon ve ark. 2003).

CBPP esas olarak zebu (*Bos indicus*) ve sığırların (*Bos taurus*) hastalığıdır. Hastalık ayrıca manda (*Bubalus bubalis*), Amerika bizonu (*Bison bison*) ve yaklarda (*Capreolus grunniens*) bildirilmiştir. Koyun ve keçilerde doğal infeksiyon oluşmakla birlikte ilişkili patolojik lezyonlar gelişmez. Amerika bizonlarında görülen bir vaka hariç yabancı ruminantlarda hastalık bildirimi olmamıştır ve evcil sığırlar arasında hastalığın yayılmasında bu hayvanların rolü olmadığı ileri sürülmektedir (OIE 2013a; OIE 2013b).

Etken bronşial salgılar, burun akıntısı, solunum havası ve nazal aerosollerde bol miktarda bulunur. Bunlardan başka salya, idrar, fetal membranlar ve uterus akıntıları ile saçılır. Bulaşma başlıca öksüren hayvanların çıkardığı damlacıkların solunması ile olur. Bulaşma için yakın ve tekrarlayan temas gereklidir fakat serin ve nemli koşullarda 200 metreye kadar yayılabilir ve bulaşma gerçekleşebilir. Fötüs plasenta aracılığıyla vertikal bulaşma bildirilmiştir (Anon. 2002).

En önemli infeksiyon kaynağı belirti göstermeyen taşıyıcı hayvanlardır. İnfeksiyonu geçiren ve iyileşen hayvanlar, etkeni yaklaşık 2 yıl süreyle akciğerlerinde taşıyabilirler ve stres ya da immunosupresif bir hastalık sonrasında etkeni saçmaya devam ederler. Bunun yanında hayvan hareketleri de hastalığın yayılmasında çok önemli rol oynar. Salgınlar çoğunlukla infekte hayvanların sağlıklı sürüye katılmasıyla oluşur. Mikroorganizma çevrede uzun süre canlı kalamadığından fomitler aracılığı ile gerçekleşen indirekt bulaşmanın hastalığın epidemiyolojisinde önemli olmadığına inanılmaktadır (Anon. 2008; Spickler ve ark. 2010).

CBPP, neden olduğu ölümler, süt üretiminde düşüş gibi direkt olarak ve canlı ağırlık kaybı, döl veriminde azalma, uluslararası ticarete neden olduğu kısıtlamalar ile

de indirekt olarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. (Radostits ve ark. 2007). Hastalığın ekonomik maliyetinin hesap edildiği ülkelerden Tanzanya’da, CBPP’nin hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine verdiği zararın 14 yılda 136 milyon USD olduğu bildirilmiştir (Tambi ve ark. 2006). Tüm Afrika kıtası için yapılan hesaplamalara göre de, sadece ölüm ve hastalık nedeniyle oluşan kaybın 30 milyon € olduğu; hastalıkla mücadele, üretimin düşmesi ve uluslararası ticaret kısıtlamaları da eklendiğinde oluşan toplam kaybın 50 milyon €’ya yaklaştığı rapor edilmiştir (Tambi ve ark. 2006). Günümüzde Afrika’nın en fazla ekonomik öneme sahip sığır hastalığı (Aliyu ve ark. 2000; Andrews ve ark. 2004) ve şap hastalığı ile birlikte en önemli sınır aşırı hastalığıdır (Nicholas ve ark. 2008). Uzak Doğu’da, son olarak 1997 yılında Pakistan’ın ari olduğunun rapor edilmesinin ardından hastalığın bulunmadığı düşünülmektedir (Nicholas ve ark. 2008). Çin’de 2007 yılında yapılan bir çalışmada hem ELISA hem de CFT ile seropozitiflik rapor edilmiş olmasına karşılık (Xin ve ark. 2007) bunların gerçek pozitiflik olduğuna şüphe ile yaklaşılmaktadır (Nicholas ve ark. 2008). Güney Amerika’da hastalık hiç ortaya çıkmamıştır (Andrews ve ark. 2004). Orta Doğu’da ise bazı Arap ülkelerinde 1990-1995 yılları arasında seyrek olarak salgınlar rapor edilmiştir (Nicholas ve ark. 2008). CBPP kaynaklı kayıplara ilişkin verilerin bulunduğu bir diğer ülke olan Portekiz’de, 1983-1999 yılları arasında 85000 sığırın kesime tabi tutulduğu ve toplam mali zararın tahmini 207 milyon € olduğu bildirilmektedir. İtalya’da ise 1990-1993 yıllarındaki salgınlarda yaklaşık 24000 sığır itlaf edilmiştir (Nicholas ve ark. 2008). Avrupa kıtasında 1990’ların sonundan itibaren CBPP görülmediği bildirilmektedir (Nicholas ve ark. 2008).

Ülkemizde 1994 yılında yapılan bir çalışmada farklı bölgelerde yetiştirilen hayvanlardan toplanan 750 serum komplement fikzasyon testi (CFT) ve agar jel difüzyon testi ile incelenmiş ve pozitiflik saptanmamıştır (Erdağ ve Türkaslan 1994). Bir başka çalışmada ise CBPP teşhisi için laboratuvara gönderilen 253 serum örneği serolojik olarak test edilmiş ve hiçbir serum pozitif olarak saptanmamıştır (Erdenlig ve ark. 2009). Hastalığa ilişkin ülkemizde yapılan en kapsamlı survey çalışmasında, Doğu Anadolu’daki dört farklı mezbahaya kesim için gelen 945 hayvan incelenmiştir. CFT ve cELISA ile sırasıyla 2 ve 4 serum örneği pozitif olarak bulunurken, pnömonili olduğu gözlenip bakteriyolojik olarak incelenen 62 adet akciğer örneğinden *MmmSC* izole edilmemiştir (Cetinkaya ve ark. 2003). Ülgen ve ark. (1996), Bursa İli’nden gelen akciğerlerde kültür ile *MmmSC*’yi izole etmişlerdir.

Hastalığın klinik olarak ilk kez rapor edildiği 1765 yılından günümüze kadar hastalığın klinik bulguları detaylı bir şekilde tanımlanmıştır. Hastalığın klinik seyri perakuttan subkliniğe kadar geniş bir yelpazede şekillenebilmektedir (Masiga ve ark. 1996). Avustralya’da deneysel olarak oluşturulan bir enfeksiyonda, aerosol yolla etken verilen hayvanların %8’inde perakut, %14’ünde akut, %30’unda hafif ve %23’ünde subklinik enfeksiyon şekillenmiş, %25’inde ise gerek klinik gerekse serolojik olarak enfeksiyon belirtisi gözlenmemiştir (Provost ve ark. 1987). Afrika’daki endemik bölgelerde görülen doğal enfeksiyonlarda ise genel olarak vakaların %13’ü perakut, %20’si akut ve %46’sı subakut seyrlidir. Hayvanların %21’i ise hastalığa dirençlidir (Masiga ve ark. 1996).

Doğal koşullarda inkübasyon süresi genelde 1-4 aydır. Erişkinlerde hastalık depresyon, iştahsızlık ve orta derecede ateş ile başlar. Bu belirtileri öksürük, göğüs bölgesinde ağrı ve hızlı solunum takip eder. Hastalık ilerledikçe solunum güçlüğü gelişir. Hasta hayvan göğüs bölgesindeki ağrıyı azaltmak ve solunumu rahatlatmak için ön ayaklarını göğüs kafesinden uzaklaştırarak durur. Oskültasyonda, muayene edilen göğüs bölgesinin etkilenme durumuna göre çıtırtı sesleri ve plöral sürtünme sesleri duyulur. Perküsyonda göğüs kafesinin alt kısımlardan mat ses alınır. İlerleyen dönemlerde hastalık çoğu kez pnömoniye ilişkin klinik belirtilerin kaybolduğu, verim kaybı ve tekrarlayan hafif ateş ile karakterize kronik forma dönüşür. Bu aşamada öksürük zorla yaptırılan egzersiz ile ortaya çıkarılabilir (Spickler ve ark. 2010).

Genel olarak 6 aya kadarki buzağılarda solunum sistemi tutulumunun olmadığı bilinmektedir. Böyle hayvanlarda şişmiş ve sıcak eklemlerle karakterize poliartrit gelişir. En çok etkilenenler karpal ve tarsal eklemlerdir. Eklemler ağrılıdır ve buzağılar hareket etmek istemez. Ancak, Portekiz’in Entre-Douro e Minho bölgesinde 6 aydan küçük buzağılarda tipik akciğer lezyonlarının bulunduğu hastalık tablosu bildirilmiştir (Regalla ve ark. 1996; Anon. 2008).

Bir sürüde erişkinlerde solunum belirtileri ile gençlerde artritin birlikte bulunması CBPP için önemli bir klinik ipucudur (OIE 2013b). Yine de hastalığın tespitinde klinik teşhis güvenilir bir yöntem değildir. Örneğin İtalya’daki CBPP vakalarında klinik bulguların hafif olması nedeniyle, hastalığın laboratuvar muayeneleriyle doğrulanmış olduğu sürülerde bile hasta hayvanların bireysel olarak tespiti çoğu kez mümkün olmamıştır (Regalla ve ark. 1996).

Avrupa kıtasındaki CBPP salgınlarında, Afrika'daki %10-70 mortalite oranlarının aksine, düşük oranda ölümler şekillenmiş veya hiç ölüm gözlenmemiştir. Hayvanların çoğunda kronik hastalık tablosu gelişmiş ve çoğu kez hastalık post-mortem muayenede karakteristik patolojik lezyonların görülmesiyle fark edilmiştir. Araştırmacılar bu durumu Avrupa'daki sığırların iyi bakım-besleme koşulları ve düşük stres sayesinde daha sağlıklı olmalarına bağlamıştır. Avrupa'daki hafif seyirli hastalık profilinin bir istisnası, infekte hayvanların tipik klinik belirtiler gösterdiği Portekiz'in Vila do Conde şehrinden rapor edilmiştir (Nicholas ve ark. 2008; Regalla ve ark. 1996).

CBPP'de nekropsi bulguları karakteristiktir. Akciğer lezyonları kokusuzdur ve genellikle tek taraflıdır (Anon. 2008). Portekiz'de yapılan bir çalışmada akciğer lezyonlarının %95'inin tek taraflı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca diaframatik lobların kranial loblardan daha çok etkilendiği tespit edilmiştir (Egwu ve ark. 1996). Namibya'dan yapılan bir bildirimde de patolojik değişikliklerin %80'e yakınının tek akciğerde yer aldığı belirtilmiştir (Nicholas ve ark. 2008).

Akciğerde görülen en önemli bulgular genişlemiş interlobüler septa ile lobüllerde konsolidasyon; ödem, fibrin ve fibrozis sonrası interlobüler septada kalınlaşma ve bunların sonucunda akciğerlerin karakteristik mermer görünümü almasıdır. Plöra boşluğunda, zamanla büyük fibrin pıhtıları oluşturarak pıhtılaşan bol miktarda (bazen 30 litre) saman sarısı renginde eksudat bulunur (Anon. 2008). Araştırmacılar, bu sıvının etkeni saf kültür halinde izole etmek için veya PCR için ideal örnek olduğunu ifade etmektedir (Nicholas ve Bashiruddin 1995).

İyileşen veya kronik hasta hayvanların akciğerlerinde "sekestra" adı verilen, fibröz kapsülle çevrili gri nekrotik dokudan ibaret patolojik oluşumlar bulunur. Koagülasyon nekrozu sonucu şekillenen bu lezyonlar, içlerinde aylarca canlı mikoplazmaları barındırarak hastalığın yayılmasında önemli rol oynarlar (Anon. 2008). Avrupa'daki CBPP'de en sık rastlanan lezyonun sekestra olduğu bildirilmiştir. Ancak özellikle salgın durumunda ilk aşamada hastalanan hayvanlarda akut lezyonlar da gözlenmiştir. Sekestralar Afrika'nın endemik bölgelerinde de en yaygın patolojik lezyondur (Nicholas ve ark. 2008). Hastalıkta plörada gözlenen bulgu fibrin birikimleri ve kalınlaşma ile izlenen fibrinöz plöritis tablosudur (Ter Laak 1992). Buzağılardaki CBPP'de ise lezyonlar bursit ile karpal ve tarsal eklemlerde fibrinöz artrittir (Provost ve ark. 1987). CBPP'de mikroskopik lezyonlar patognomonik olmadığından histopatolojik

muayenenin teşhisteki değeri sınırlıdır. İnfeksiyon, akciğer ve plörada şiddetli hiperemi ve ardından eritrosit, nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu ile başlar. Alveoller ve interlobüler septada yoğun seröfibrinöz materyal birikimi oluşur. Etkilenen akciğer bölgesinde vaskülit ve arteriyel trombozlar şekillenir. Damarlardaki bu değişiklikler damarın beslediği bölgede infarktüse ve sonunda sekestroya yol açar. Sekestra oluşumundaki aşamalar sırasıyla; infarktüs, nekrotik bölgenin yangısal hücreler tarafından çevrenmesi ve nekrotik doku ile sağlıklı doku arasında granülasyon ve fibrozis şekillenmesidir (Andrews ve ark. 2004).

CBPP’de ayrıca mediastinal, sternal, aortik ve interkostal lenf düğümlerinde genişleme, ödem ve bazen kanamalar olduğu bildirilmiştir. Ayrıca lenf damarlarında tromboz ve ileri dönemde fibroz geliştiği belirtilmiştir (Nicholas ve ark. 2000).

Scanziani ve arkadaşları (1997), İtalya’daki CBPP vakalarında immunohistokimyasal olarak akciğer lezyonlarının şiddetinin lenf düğümlerindeki lezyonların şiddetiyle uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Akut enfeksiyonda lobüllerin periferinde ve alveoler makrofajların sitoplazmasında *MmmSC* antijenini saptamışlardır. Kronik lezyonlarda ise antijenin fibrotik alanlarda ve interlobüler septadaki makrofajlarda bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca mikroorganizma antijeni sekestraların içinde yer alan nekrotik materyalde ve makrofajlarda tespit edilmiştir. Lenf düğümlerinde ise antijenin foliküllerde yoğunlaştığı gözlemlenmiştir.

Hastalıktaki histolojik değişiklikler CBPP’ye özgü olmadığından kesin tanı için laboratuvar incelemelerine gereksinim vardır. CBPP’nin laboratuvar tanısı *MmmSC*’nin bakteriyolojik izolasyonu, nükleik asidinin PCR ile tespiti ve antikorlarının serolojik tespiti ile yapılır (OIE 2013a).

Direkt PCR testleri günümüzde *MmmSC* tanısını oldukça kolaylaştırmış olsa da, daha önce hastalığın bulunmadığı bölgelerde etken izolasyonu ve identifikasyonunu önerilmektedir (Nicholas ve ark. 2008). İzolasyon amacıyla canlı ve ölü hayvanların solunum sistemlerinden örnek toplanması önerilmektedir. Ter Laak (1992), akciğerlerden etkenin saçımındaki düzensizlikten dolayı canlı hayvanların burun akıntılarında mikroorganizma sayısının büyük ölçüde değişebileceğini bildirmiştir. Eklem tutulumunda uygun örnek eklem sıvısıdır. Mikoplazmalar çevresel koşullara ve kurumaya oldukça duyarlı oldukları için, ayrıca bakteriyel kontaminantların üremesinin engellenmesi için örneklerin laboratuvara mikoplazmalar için spesifik transport besiyeri

içinde gönderilmesi önerilmektedir. Örnekler laboratuvara 1-2 gün içerisinde ulaştırılabiliyorsa +4°C' de, daha uzun süre de ulaştırılabilecekse dondurulmuş olarak saklanmalıdır (OIE., 2013a). Örneklerin transport besiyeri ve uygun sıcaklık koşullarında taşınmaması durumunda özellikle sıcak iklim koşullarında izolasyon şansının çok azalacağı bildirilmiştir (Anon. 2001).

MmmSC, Eaton's medium ve Hayflick's medium gibi yaygın kullanılan mikoplazma besiyerlerinde kolaylıkla üremektedir (Miles ve Nicholas 1998; OIE 2013a;). Besiyerleri, mikoplazmaların üremesi için gerekli besin maddelerinin yanı sıra diğer bakterilerin üremelerini engelleyen inhibitörler içermektedir. Örneklerin sıvı besiyeri içinde on katlı dilüsyonları (en az beş) yapılarak hem katı hem de sıvı besiyerlerine ekim yapılması önerilmektedir. Dilüsyon yapılmasının amacı kontaminasyonları azaltmak ve doku içinde bulunabilen antibiyotik ve diğer doğal mikoplazma inhibitörlerinin etkilerini en aza indirmektir (OIE 2013a). Provost ve ark. (1987) organ örneklerinde bulunabilecek bu inhibitörlerin arasında antikorlar, komplement, lizolesitin ve lesitin'in bulunduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, dilüsyon metoduyla çoğunlukla ikinci ve üçüncü tüplerde kontaminasyonun elimine edildiğini belirtmektedir.

MmmSC'nin mikoplazma besiyerlerinde kolaylıkla üremesine karşın bunun bir istisnası March ve ark. (2000) tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar, Botsvana'dan izole edilen ve M375 adı verilen suşun diğer Afrika ve Avrupa suşlarına kıyasla besiyerlerinde çok daha güç ürediğini bildirmişlerdir. Suşun ayrıca koloni morfolojisi, immunoblotting bant profili ve biyokimyasal özellikler açısından önemli farklılıkları bulunduğunu saptamışlar ve bütün bunların genetik delesyondan kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir.

Mikoplazma türleri yüksek nem oranında iyi ürediği için, ekim yapılan besiyerleri mutlaka yüksek nemli ortamda ve 37°C'de inkübe edilmelidirler. Provost ve ark., aerobik atmosferin *MmmSC*'nin üremesi için yeterli olduğunu ifade etse de, çoğu araştırmacı ve OIE inkübasyonun mikroaerob koşullarda yapılmasını önermektedir (Provost ve ark. 1987; OIE 2013a). Üreme sıvı besiyerinde bulanıklık, katı besiyerinde 1 mm büyüklüğünde düğmeli tipik mikoplazma kolonileri şeklinde gözlenir. Negatif kararı verebilmek için 2-3 kör pasaj gereklidir (OIE 2013a).

İzolatların identifikasyonu biyokimyasal testler, immunolojik testler ve PCR ile yapılır. Rutinde immunolojik metotlar ve PCR identifikasyon için yeterli olup biyokimyasal testlere şüpheli durumlarda başvurulması önerilmektedir. Ayrıca, sadece biyokimyasal testler identifikasyon için yeterli olmamaktadır. *MmmSC* şüpheli kültürlerle uygulanabilen biyokimyasal testler dijitonin duyarlılığı, film-spot oluşumu, glikoz fermentasyonu, aerobik ve anaerobik tetrazolyum redüksiyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve proteolitik aktivitedir (Tablo 2-3) (OIE 2013a).

Tablo 2-3: Sığır solunum sisteminden izole edilen mikoplazmaların biyokimyasal özellikleri

Tür	D	FS	G	A	F	P	T1	T2
<i>M. alkalescens</i>	+	–	–	+	+	–	–	–
<i>M. bovis</i>	+	+	–	–	+	–	+	+
<i>M. bovirhinis</i>	+	–	+	–	±	±	+	+
<i>M. canis</i>	+	–	+	–	–	±	–	+
<i>M. californicum</i>	+	–	–	–	+	b	–	±
<i>M. canadense</i>	+	–	–	+	z	b	–	+
<i>M. dispar</i>	+	–	+	–	–	b	+	+
<i>MmmSC</i>	+	–	+	–	–	+	+	+
<i>M. leachii</i>	+	–	+	–	–	+	+	+
<i>M. arginini</i>	+	–	–	+	–	–	–	+
<i>A. laidlawii</i>	–	–	+	–	–	–	+	+

D: Dijitonin sensitivitesi, F: Film-spot oluşumu G: Glikoz fermentasyonu, A: Arjinin hidrolizi, F: Fosfataz aktivitesi, P: Proteolitik aktivite, T1: Aerobik tetrazolyum redüksiyonu, T2: Anaerobik tetrazolyum redüksiyonu, b: bilinmiyor, z: zayıf reaksiyon

Etkenin moleküler teşhisi için kullanılan yaygın yöntem konvansiyonel ve real-time PCR'dır. PCR testinde plöra sıvısı ve akciğerden DNA ekstrakte edilerek *MmmSC* spesifik primerler ile DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Alternatif olarak, sıvı besiyerinde 24-48 saat zenginleştirme yapıldıktan sonra kültürden PCR yapılabilir. PCR yöntemi özellikle antibiyotik kullanılmış hayvanlardan alınan, kötü saklama ve gönderme koşulları nedeniyle kontamine olmuş veya canlı mikoplazma içermeyen örneklerde etkenin saptanması açısından, kültüre oranla daha iyi sonuç vermektedir

(OIE 2013a). Egwu ve ark. (1996) ayrıca az sayıda etken içeren örneklerden de PCR ile hastalığın teşhisinin yapılabildiğini bildirmişlerdir. Serolojik testlerle kıyaslandığında ise, tür içi antijenik çeşitlilik ve türler arası antijenik çapraz reaksiyonlardan etkilenmemesi nedeniyle moleküler testlerin serolojik testlerden daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Le Grand ve ark. 2004). CBPP'nin teşhisi için günümüze kadar çeşitli konvansiyonel PCR testleri geliştirilmiştir. Miserez ve ark. tarafından geliştirilen nested PCR testinin konvansiyonel PCR testlerinden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Miserez ve ark. 1997). Lorenzon ve ark. (2000) tarafından geliştirilen PCR metodu ise T1 aşısı suşunu diğer *MmmSC* suşlarından ayırt edebilmektedir. Gorton ve ark. (2005) konvansiyonel ve nested PCR testlerinin dezavantajı olan amplifikasyon sonrası elektroforez aşamasına gereksinimini ortadan kaldıran real-time PCR testi geliştirmişlerdir.

Hastalığın teşhisi için kullanılan bir diğer yöntem infekte dokular, vücut sıvıları ve kültürlerle uygulanan immunolojik testlerdir. Bu amaçla floresan antikor testi, indirekt floresan antikor testi, üreme inhibisyon testi, agar jel immunodifüzyon, membran filtre üzerinde dot immunobinding testi (MF-dot) ve immun peroksidaz testleri uygulanabilmektedir. İmmunolojik testlerin en önemli dezavantajı, örnekte yüksek miktarda etkene veya antijenine ihtiyaç duymasındır (OIE 2013a).

İnfekte hayvanların kan serumlarında antikor tespiti için kullanılan serolojik testler; komplement fiksasyon testi (CFT), cELISA ve immunoblotting testleridir. Serolojik testlerin sonuçları ancak sürü seviyesinde geçerli olmaktadır. Bireysel sonuçlar, hayvanın henüz antikor gelişmeyen erken dönemde veya düşük antikor titreli kronik dönemde olabilmesi nedeniyle yanıltıcıdır (OIE 2013a). OIE tarafından önerilen serolojik yöntemler, CFT ve cELISA'dır. Ancak Nicholas ve ark. (2008), her ikisinin de istenilen duyarlılıkta olmadıklarını bildirmiştir. Marobela-Raborokgwe ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada cELISA'nın CFT'den daha tutarlı sonuçlar verdiğini ancak daha düşük duyarlılıkta olduğunu saptamışlardır. Bruderer ve ark. (2002) geliştirdikleri LppQ-N proteinine dayalı rekombinant indirekt ELISA'nın CFT ve cELISA kadar duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Xin ve ark. (2007) bu ELISA'yı CFT tekniğini kullanarak Tibet ve Çin'de yaklaşık 4000 serumu test etmiş ve CFT ile uyumunun iyi olduğunu ve duyarlılığının bir miktar daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

CBPP’de tedavinin etkinliği halen tam olarak kanıtlanmamıştır. OIE tarafından antibiyotikle tedavi tavsiye edilmemekte ise de sahada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi antibiyotiklerin kronik taşıyıcılara ve dirençli suşların gelişmesine neden olmasıdır. Kontrol metotları epidemiyolojik duruma, sürülerin özelliklerine ve ülkedeki veteriner hizmetlerinin durumuna göre seçilmesi önerilmektedir. Ari bölgelerde karantina, hayvan hareketlerinin kontrolü, serolojik tarama ve pozitif hayvanlar ile bunlara teması olanların zorunlu kesimi tavsiye edilmektedir. Hastalığın yayılmasını engellemede en etkili yol hayvan hareketlerinin kontrolüdür. Endemik bölgelerde aşılama önemli bir kontrol aracıdır. Günümüzde sadece attenüe suşlardan hazırlanan aşı yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan iki suş T1/44 ve T1sr’dır. Ari ve düşük prevalanslı bölgelerde aşılama OIE tarafından önerilmemektedir (Provost ve ark. 1987; Ter Laak 1992; OIE 2013b).

2.4. Sığırların *Mycoplasma bovis* Pnömonisi

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) Avrupa ve Amerika’da en yaygın olarak saptanan sığır mikoplazmasıdır (Miles ve Nicholas 1998). Sığırlarda oluşturduğu önemli enfeksiyonlar mastit, pnömoni, artrit ve otittir (Miles ve Nicholas 1998; Nicholas ve ark. 2008). Bunun yanında genital sistemde ve gözde enfeksiyona neden olur (Miles ve Nicholas 1998). *M. bovis*, sığır solunum sistemi hastalıkları kompleksine (BRD) neden olan en önemli mikoplazma türüdür (Nicholas ve Ayling 2003). Buzağı ve danalar yaşlı sığırlara göre *M. bovis*’e daha duyarlıdır (Miles ve Nicholas 1998; Nicholas ve Ayling 2003) ve çoğu kez *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* ve *Pasteurella multocida* gibi diğer bakteriyel etkenlerle birlikte izole edilir (Miles ve Nicholas 1998).

M. bovis, *Mycoplasma* cinsinin genel özelliklerini taşır. Hücreler kokoidden kısa filamentlere kadar değişik şekillerde olabilir. Hareketsizdir, biyofilm oluşturur ve çoğu mikoplazmaya göre çevresel koşullara daha dayanıklıdır. Katı besiyerinde tipik sahanda yumurta görünümlü ve büyük düğmeli koloniler oluşturur. İdeal üreme sıcaklığı 37°C’dir. *M. agalactiae* ile ortak yüzey antijenlerine sahiptir ve bu durum serolojik testlerde sorun oluşturmaktadır. Birbiriyle yakın ilişkili bu iki türü ayırt edebilen moleküler testler geliştirilmiştir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. bovis birkaç istisna dışında sadece sığırlardan izole edilmektedir (Nicholas ve ark. 2008). Bulaşma solunum salgılarıyla çıkan etkenlere direkt veya indirekt temas ile olur. Mastitli ineklerin sütüyle, ayrıca solunum salgılarıyla kontamine gıda ve suyun

tüketimi şeklinde sindirim yolu ile bulaşma şekillenmektedir (Maunsell ve ark. 2011). Araştırmacılar etkenin kolonize olduğu ve saçıldığı primer vücut bölgelerinin üst solunum yolları mukozası ve meme bezi olduğunu bildirmişlerdir (Bennett ve Jasper 1977; Punyapornwithaya ve ark. 2010). Woldehiwet ve ark. (1990) *M. bovis*'in solunum sisteminden saçılımını taşıma, kalabalık, besiye alınma ve soğuk gibi stres faktörlerinin arttırdığını rapor etmişlerdir. Pftzner (1990), infekte sığırların etkeni solunum yollarından yıllarca saçtığını ve bu şekilde hastalık için rezervuar oluşturduklarını bildirmiştir. Maunsell ve ark. enfeksiyonun sürü içinde devamlılığundan ve duyarlı sürülere girişinden büyük ölçüde *M. bovis*'i aralıklı olarak saçan kronik infekte hayvanların sorumlu olduğunu ifade etmişlerdir (Maunsell ve ark. 2011). Buzağılarda önemli bir bulaşma yolu *M. bovis* ile infekte sütle beslenmedir. Bennett ve Jasper (1977) tarafından yapılan bir çalışmada infekte süt ile beslenen buzağuların burun mukozalarının kolonizasyon oranı infekte olmayan sütle beslenenlerinkinden çok daha yüksek bulunmuştur.

M. bovis enfeksiyonları tüm dünyada görülmektedir. *M. bovis*'in gerçek prevalansının düşünülenenden fazla olduğu tahmin edilmektedir. Bunun sebebi pnömoni vakalarından ko-enfeksiyon oluşturan diğer bakteriyel etkenlerin kolayca izole edilmesi ve çoğu laboratuvarın pnömonilerde rutin mikoplazma kültürü yapmamasıdır (Nicholas ve ark. 2008). Tüm Avrupa'da sığır pnömonileri nedeniyle yılda 576 milyon € kayıp olduğu açıklanmıştır. Bunun üçte birinin *M. bovis* nedeniyle meydana geldiği tahmin edilmektedir. ABD'de *M. bovis*'in solunum yolu enfeksiyonlarının yıllık maliyetinin, sadece canlı ağırlık artışında ve karkas ağırlığındaki düşüş hesaplandığında 32 milyon USD olduğu bildirilmiştir (Nicholas ve Ayling 2003).

Ülkemizde sığır pnömonilerinde *M. bovis*'in tespiti amacıyla çok az sayıda çalışma yapılmıştır. 2008 yılında rapor edilen bir çalışmada 8 pnömonili sığır akciğerinin 4'ünde ve klinik hastalık bulunan sürülerden alınan 16 adet svabın 13'ünde etken saptanmıştır (Çetinkaya ve ark. 2008). Etken, 2009 yılında 100 pnömonili sığır akciğeri üzerinde yapılan bir çalışmada 4 örnekte (Özen ve ark. 2009) ve başka bir çalışmada bir buzağı yetiştirme ünitesinden alınan 43 pnömonili akciğerin tümünde saptanmıştır (Özdemir ve ark. 2009). Ülkemizde *M. bovis*'in varlığının araştırılmasına yönelik yapılan az sayıdaki çalışmaya rağmen bunların tamamında *M. bovis* çeşitli oranlarda tespit edilmiştir.

Hastalığın doğal seyrinde inkübasyon süresini belirlemek güçtür. Caswell ve Archambault hastalıklı buzağlarla bir araya getirilen sağlıklı buzağlarda 2 hafta sonra hastalık geliştiğini bildirmiştir (Caswell ve Archambault 2007). Stipkovits ve ark. (2000) oluşturdukları deneysel infeksiyonda klinik belirtilerin 8-10 gün sonra ortaya çıktığını rapor etmiş, Pfutzner (1990) ise inkübasyon süresini 2-6 gün olarak saptamıştır.

M. bovis pnömonisi her yaştaki sığırdan görülebilmektedir (Maunsell ve ark. 2011). Klinik belirtiler non-spesifik olup başlıca öksürük, hızlı solunum, solunum güçlüğü, hafif ateş, depresyon, iştahsızlık, zayıflama, göz akıntısı ve artrit gözlemlenir (Caswell ve Archambault 2007; Nicholas ve ark. 2008). Hastalık antibiyotik tedavisine cevap vermez ve kronikleşme eğilimindedir (Aiello ve Moses 2013). Klinik bulgular diğer pnömonilerdekilerle aynı olsa da topallık, tedaviye direnç ve kronikleşme, *M. bovis* pnömonisini akla getirir (Caswell ve Archambault 2007). Pfutzner ve Sachse (1996) Pastörellalar, Stafilokoklar ve Streptokoklar ile sekonder infeksiyon gelişmesi durumunda pnömoninin şiddetinin arttığını ve tedaviye cevabın daha da azaldığını bildirmiştir. Artrit şekillendiği durumlarda klinik bulgu olarak topallık, bir veya daha çok eklemde ağrı ve vakaların yalnızca bazılarında eklemlerde şişlik gözlenir (Caswell ve Archambault 2007). Bazı vakalarda solunum sistemi bulgularına otitis media eşlik eder (Maunsell ve ark. 2011). Caswell ve ark. (2010) besiye alınan 12.039 buzağının 158'inde (%1,3) kronik solunum hastalığı şekillendiğini, bunların %39'unda artrit geliştiğini ve %40'ının ortalama 2 hafta içinde öldüğünü yada ötanazi yapıldığını bildirmiştir.

Nekropside, akciğerdeki patolojik bulgular interstisyel pnömoni, lenfositik bronşit, kataral bronkopnömoni veya kazeöz ve koagülatif nekrozlu kronik bronkopnömonidir (Nicholas ve ark. 2008; Aiello ve Moses 2013). Maunsell ve ark. (2011) ayrıca bazı vakalarda akut veya kronik fibrinli plörit şekillendiğini bildirmiştir. *M. bovis* infeksiyonundaki en yaygın lezyon tipinin kronik kazeo-nekrotik pnömoni olduğu rapor edilmiştir. Çoğunlukla lezyonlar kranioventral yerleşimlidir ve çift taraflıdır. Toplam akciğer dokusunun %20-%90'ı hastalıktan etkilenebilir (Caswell ve ark. 2010). Caswell ve Archambault (2007), nadiren de olsa patolojik lezyonların tek taraflı olarak akciğerin orta ve kaudal loblarında bulunabildiğini, bu durumda hastalığın CBPP ile karışabileceğini bildirmiştir.

Histopatolojik muayenede; bronşlar, bronşiolle, alveoller veya interlobüler septada eoziofilik materyal ile dolu kazeonekrotik odaklar dikkati çeker. Lezyonların periferinde nekrotik ve canlı makrofajlar ile daha az sayıda nötrofiller mevcut olup ayrıca lenfosit ve makrofajları da barındıran fibröz kapsül yer alır. İmmunohistokimyasal metotlarla yapılan çalışmalarda, *M. bovis* antijeninin en yoğun olarak bu nekrotik odakların kenarında, makrofajların içinde veya serbest olarak bulunduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca mikroorganizma antijenini daha az yoğunlukta aynı bölgedeki nötrofillerin sitoplazmasında, ödematöz alveollerde ve silyalı trakeobronşial epitel hücreler arasında gözlemişlerdir (Caswell ve ark. 2010). Thomas ve ark. (1986) tarafından 7 gnotobiyotik buzağıda oluşturulan deneysel enfeksiyonda buzağuların tamamında akciğer patolojisi gelişmiş ve bir buzağıda konsolide alan akciğer yüzeyinin %37'sini kaplamıştır.

Klinik ve patolojik bulgular spesifik olmadığından teşhis için laboratuvar muayenesi gerekir. Alınması gereken örnekler akciğer, bronkoalveolar lavaj sıvısı, burun svabı ve serumdur (Nicholas ve ark. 2008). Thomas ve ark. (2002b) canlı hayvanlarda, elde edilmesi zor olmasına rağmen bronkoalveolar lavaj sıvısının burun svabına kıyasla akciğerdeki enfeksiyonu daha doğru bir şekilde yansıttığını rapor etmiştir. Çalışmada 20 hayvandan alınan bronkoalveolar lavaj sıvısı ve burun svabı kültür sonuçları ile nekropsiden sonra yapılan akciğer kültürü karşılaştırılmıştır. Ayrıca 49 hayvana ait bronkoalveolar lavaj sıvısı ve burun svabı kültür sonuçları ile solunum sistemine ilişkin klinik bulgular arasındaki uyum araştırılmıştır. İki çalışmada da bronkoalveolar lavaj sıvısının canlı sığırlarda hastalığı tespit etmek için uygun örnek olduğu sonucuna varılmıştır.

İnceleme örneklerinin *MmmSC*'de olduğu gibi transport besiyeri içerisinde gönderilmesi, 1-2 gün için +4°C'de, daha uzun süre için dondurulmuş olarak saklanması önerilmektedir (Miles ve Nicholas 1998). Araştırmacılar, soğuk koşullarda saklanmış olsa bile saatler içerisinde ekilmemiş örneklerin izolasyon oranlarının önemli ölçüde düştüğünü rapor etmiştir (Maunsell ve ark. 2011).

Solunum sistemi örneklerinden *M. bovis*'in izolasyonunun sensitivitesine ilişkin kantitatif veri bulunmasa da Caswell ve ark. (2010) kültürün hastalığın teşhisi için duyarlı bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Maunsell ve ark. (2011) örnek alınması ve taşınmasının optimum koşullarda yapılması ve uygun laboratuvar

tekniklerinden faydalanılması ile kültür yönteminin duyarlılığının artırılabilceğini bildirmişlerdir. *M. bovis* yaygın kullanılan mikoplazma besiyerlerinde kolaylıkla üremektedir. Uygun besiyeri bileşimi ve kültür tekniği *MmmSC*'de olduğu gibidir (Miles ve Nicholas 1998). İzolatların identifikasyonu biyokimyasal testler, immunolojik testler ve PCR ile yapılmaktadır (Miles ve Nicholas 1998; Nicholas ve ark. 2008) ancak Maunsell ve ark. (2011) identifikasyon için moleküler metotları önermektedir. *M. bovis* şüpheli kültürle uygulanabilen biyokimyasal testler dijitonin duyarlılığı, film-spot oluşumu, glikoz fermentasyonu, aerobik ve anaerobik tetrazolyum redüksiyonu, arjinin hidrolizi, fosfataz aktivitesi ve proteolitik aktivitedir (Tablo 2-3) (Nicholas ve Ayling 2003).

PCR tekniği hem kültürlerden *M. bovis*'in identifikasyonu hem de direkt inceleme örneklerinden etkenin saptanması amacıyla kullanılır. Araştırmacılar uzun süre saklanmış örneklerde direkt PCR'ın kültürden daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir (Maunsell ve ark. 2011). *M. bovis* için geliştirilen ilk PCR testleri 16S rDNA genini çoğaltmakta ve *M. agalactiae* ile çapraz reaksiyon vermekte idi (Pfützner ve Sachse 1996). Fakat sonradan Frey ve ark. (1999) tarafından geliştirilen, *uvrC* genine dayalı PCR bu sorunu ortadan kaldırmıştır. Benzer şekilde, sonradan geliştirilen *polC* ve *oppD/F* PCR testleri etkenin saptanmasında ve *M. agalactiae*'dan ayırt edilmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Hotzel ve ark. 1996; Marenda ve ark. 2005). Son olarak yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip real-time PCR testleri geliştirilmiştir (Cai ve ark. 2005; Sachse ve ark. 2010).

M. bovis DNA'sının örneklerden direkt tespiti amacıyla kullanıldığı durumlarda PCR testlerinden değişen oranlarda sensitivite değerleri elde edilmektedir. Hotzel ve ark. (1999), 10^2 CFU/ml'nin altında mikoplazma içeren örneklerde PCR'ın çoğunlukla negatif sonuç verdiğini bildirmiştir. Caswell ve Archambault (2007), moleküler testlerin özellikle mikoplazma izolasyonunu güçleştirecek durumlarda (kontaminasyon, antibiyotik uygulaması ve eski örnekler) uygun seçenek olacağını bildirmektedir.

M. bovis lipid ve protein antijenlere sahiptir ve bunlara karşı oluşan antikorlar aylarca kalmaktadır. Serolojik testler tarama amacıyla uygun olsa da pek çok bölgedeki yüksek seroprevalans hasta hayvanların tespiti için kullanılmalarını güçleştirir. Ayrıca antikor titreleri ile hastalığa bağışıklık arasında korelasyon bulunmamaktadır (Caswell ve Archambault 2007). Serolojik teşhiste kullanılan en

yaygın metot tüm hücre antijeninin kullanıldığı indirekt ELISA'dır. Günümüzde çeşitli ticari ELISA kitleri mevcuttur. Ghadersohi ve ark. (2005) monoklonal antikorların kullanıldığı bloking ELISA testi geliştirmişler ve bu metodun spesifite ve sensitivitesinin oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Etkenin spesifik antijenlerinden faydalanan diğer ELISA testleri ise Brank ve ark. (1999) tarafından geliştirilen VspA ELISA ile Robino ve ark. (2005) tarafından geliştirilen ve bir membran lipoproteininden yararlanan ELISA'dır.

Antibiyotik tedavisi ile etkili sonuçlar alınamasa da pratikte yaygın olarak uygulanmaktadır. Tedavide kullanılan antibiyotikler arasında tylosin, florokinolonlar, tilmikosin ve tetrasiklinler yer almaktadır. *M. bovis*'in antibiyotik duyarlılığını belirlemek için pek çok in vitro çalışma yapılmıştır (Nicholas ve ark. 2008). Son yıllardaki veriler Avrupa ve Kuzey Amerika suşlarının oksitetrasiklin, tilmikosin ve spektinomisin başta olmak üzere mikoplazma enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ajanlara karşı dirençlerinin arttığını göstermektedir (Ayling ve ark. 2000; Francoz ve ark. 2005). İn vitro çalışmalarda genellikle florokinolonlara karşı direnç bulgusu elde edilemese de İngiltere'de yapılan bir çalışmada buzağılara hastalığın başlangıcından itibaren 3 ay süreyle uygulanan florokinolon tedavisinin olumlu sonuç vermediği bildirilmiştir (Nicholas ve ark. 2006). Sahada antibiyotik tedavisinin başarısızlığını gösteren bir başka çalışmada %80 oranında *M. bovis* ile infekte besi sığırlarında antibiyotik uygulamasına cevap alınamamıştır (Haines ve ark. 2001).

Hastalığın tedavisi güç olduğundan korunma tedbirlerine önem verilmesi önerilmektedir. Korunma için en etkili yolun kapalı sürü oluşturulması, bu mümkün değilse sürüye katılan hayvanların test edilip karantinaya alınması olduğu bildirilmektedir (Maunsell ve ark. 2011).

Günümüze kadar *M. bovis* enfeksiyonlarından aşı ile korunmada etkili sonuç elde edilememiştir. Saha etkinliklerine ilişkin veri bulunmasa da halen ABD'de solunum sisteminin *M. bovis* enfeksiyonlarından korunmak için çeşitli ticari aşılar piyasada bulunmaktadır. Avrupa'da ise ticari aşı mevcut değildir (Maunsell ve ark. 2011). Nicholas ve ark. (2008) mevcut aşılar arasından etkinliği en yüksek olanının otojen aşılar olduğunu bildirmiştir.

2.5. Sığır Solunum Sisteminden İzole Edilen Diğer Mikoplazmalar

Sığırlarda pnömoni ile ilişkili bulunmuş diğer türler; *M. dispar*, *M. canis*, *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. canadense*, *M. bovirhinis* ve *M. leachii*'dir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. bovirhinis ilk kez 1967 yılında sığırların üst solunum yollarından izole edilmiştir. İlk izolasyonundan bu yana tüm dünyada hem sağlıklı hem de hasta sığır ve mandaların üst ve alt solunum yollarından izole edilmektedir. Çoğunlukla diğer patojenlerle birlikte bulunmakta ve bu nedenle sadece süperinfeksiyon yaptığı ileri sürülmektedir. *M. bovirhinis*'in teşhis açısından önemli yönü mikoplazma besiyerlerinde kolayca üreyerek *M. bovis* gibi daha patojen mikoplazma türlerinin izolasyonunu güçleştirmesidir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

Sığırlarda *M. canis* şimdiye kadar 4 ülkeden bildirilmiştir (Kanada 1974, Hollanda 1993, İngiltere 1995 ve Belçika 2002) ancak son yıllarda izolasyon oranlarında artış görülmektedir. Sığırlarda solunum sistemi hastalığına yol açtığına dair güçlü deliller bulunmaktadır. Biyokimyasal özellikleri *M. bovirhinis*'e benzediğinden çeşitli çalışmalarda *M. bovirhinis* olarak rapor edilen bazı türlerin *M. canis* olabileceği ileri sürülmüştür. İki tür biyokimyasal olarak benzer olsa da serolojik olarak yakın ilişkili değildir (Nicholas ve ark. 2008).

M. alkalescens ilk kez 1963 yılında Avustralya'da sığırların burun boşluğundan izole edilmiştir. Avrupa ve Kuzey Amerika kıtalarında görülmektedir. Besiyerine arjinin ilavesi ile daha iyi ürer ve arjininden alkalik ürünler oluşturur. Arjinini fermente eden pek çok mikoplazma türü ile ortak yüzey antijenlerine sahiptir fakat bu durumun yalnızca *M. arginini*'nin ayırıcı teşhisinde sorun olabileceği ileri sürülmüştür (Tully ve Whitcomb 1979; Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. californicum esas olarak sığırlarda purulent mastit etkeni olup pnömoni ile de ilişkilendirilmiştir. Avrupa ve ABD'de görülmektedir. Hücreler kokoidden filamentöze kadar değişik şekillerde olabilir. *M. californicum*'un hareket durumu belirlenmemiştir. Kolonilerinin düşme kısmı küçük fakat belirgindir. İdeal üreme sıcaklığı 37 °C'dir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. canadense Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygındır. Sığırlarda başlıca mastit ve artrit etkenidir, ayrıca pnömoniye yol açtığı düşünülmektedir. Hücre morfolojisi

kokoid-kokobasiller şeklindedir. Besiyerine arjinin ilavesi ile daha iyi ürer (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. leachii sığırlarda başlıca mastit ve artrite neden olur ancak pnömoniye yol açtığı da düşünülmektedir. İlk kez 1967 yılında Avustralya'da izole edilmiştir ve günümüzde Avustralya ve İsviçre'de yaygındır. Hareketsiz olup pleomorfik morfolije sahiptir. Besiyerlerinde hızlı ürer ve katı besiyerinde tipik sahanda yumurta görünümünde koloniler oluşturur. *M. leachii*, *M. mycoides* cluster üyesidir. Bunun sonucu olarak CBPP etkeni *MmmSC*'nin teşhisinde problem oluşturur (Tully ve Whitcomb 1979; Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

M. dispar ilk kez 1970 yılında tanımlanmıştır. Dünyanın çoğu bölgesinden bildirilmiş olsa da yalnızca Avrupa ve Kuzey Amerika'da yaygındır. *M. dispar* çoğunlukla diğer patojenlerle birlikte pnömoniye neden olur. Etken kapsüllü olup kolonileri granüllü ve genellikle düğmesizdir (Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

Sığır solunum sisteminden patojen mikoplazmaların yanı sıra *M. arginini* ve *Acholeplasma laidlawii* (*A. laidlawii*) gibi apatojen türler de izole edilmektedir. Bu türlerin laboratuvar teşhisi açısından esas önemi, karışık kültürlerde daha hızlı üreyerek patojen türün saptanmasını zorlaştırmalarıdır. İlk kez 1968 yılında izole edilmiş olan *M. arginini*, günümüzde insan ve çok çeşitli evcil ve yabani memeli türlerinde yaygın olarak izole edilmektedir. Rapor edildiği türler arasında koyun, keçi, domuz, at, köpek, kedi, aslan, deve, fare, vaşak, çita ve dağ keçisi yer alır. *M. arginini* başlıca kokoid formda bulunur. Hareket durumu bilinmemektedir. Koloniler ya tipik sahanda yumurta görünümünde ya da granüler yapıdadır. Besiyerine arjinin ilavesi ile daha iyi ürer. İdeal üreme sıcaklığı 37 °C'dir. *M. arginini*'nin değişik çevresel koşullara direçli olduğu bilinmektedir (Nagatomo ve ark, 2001; McAuliffe ve ark. 2005; Nicholas ve ark. 2008; Krieg ve ark. 2010).

A. laidlawii insan, çok çeşitli hayvan türleri, artropodlar ve bitki yüzeylerinin yanı sıra doğadan da izole edilebilmektedir. *A. laidlawii*, *Acholeplasmatales* takımında yer alır ve tip türdür. Bu takımın ayırt edici özellikleri üremeleri için serum ve kolesterole ihtiyaç duymamaları; insan, omurgalı hayvanlar ve artropodlar gibi çok çeşitli habitatlarda bulunmalarıdır. Diğer pek çok özellikleri açısından *Mycoplasma*

cinsine benzerler. *Acholeplasma* cinsi *Mycoplasma* cinsinden dijitonine duyarlı olmamalarıyla ayırt edilir (Krieg ve ark. 2010).

A. laidlawii hücreleri çoğunlukla filamentler şeklinde görülür. Serum içeren katı besiyerinde tipik sahanda yumurta görünümünde koloni oluşturur fakat koloniler diğer mikoplazmalara göre büyüktür. Serumsuz katı besiyerinde ise koloniler daha küçüktür ve bazen sadece düğme kısmı şekillenir. Sıvı besiyerinde *Mycoplasma* cinsine kıyasla daha yoğun bulanıklık oluşturur. 20-41 °C arası sıcaklıklarda üreyebilse de en uygun inkübasyon sıcaklığı 37 °C'dir (Krieg ve ark. 2010).

2.6. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

Denatüre edici gradient jel elektroforezi (DGGE), PCR ürünlerinin sekanslarına göre denatüre edici jel “gradient”inde ayrılması prensibine dayalı bir moleküler parmak izi yöntemidir. Yöntem teorik olarak DNA'daki tek baz mutasyonlarını tespit edebilecek hassasiyettedir (Fischer ve Lerman 1983; Cotton ve ark. 1999). Metot, denatüre edici kimyasallarla birbirinden ayrılan komplementer DNA iplikçiklerinin jelde göçünün durması prensibine dayanır. Bantların jelde göçü DNA segmentinin denatürasyon davranışına göre şekillenir. Çift iplikçikli amplikon, jelde göçü boyunca artan konsantrasyonda kimyasal denatüre ediciye (gradient) maruz kalır ve baz dizisi tarafından belirlenen bir noktada denatürasyon gerçekleşerek göç durur. Bu da değişik bant profillerinin oluşumuna yol açar (McAuliffe ve ark. 2005; Walker ve Rapley 2005). Yöntem, mikrobiyel ekolojide çeşitlilik analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Muyzer 1999) ancak patojen mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanımı azdır ve yaklaşık on beş yıllık geçmişi vardır (McAuliffe ve ark. 2005).

McAuliffe ve ark. (2005) tarafından mikoplazmaların identifikasyonu için geliştirilen ve bu çalışmada yararlanılan 16S rDNA PCR/DGGE metodu ile; ilk aşamada 16S rDNA geninin yaklaşık 200 bp'lik bir kısmı mikoplazma spesifik primer çifti ile çoğaltılmakta, ikinci aşamada DGGE ile amplikonun baz dizilerine göre ayrılması sağlanarak tür seviyesinde identifikasyon gerçekleştirilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekler

Çalışmada Ocak 2012 ile Aralık 2013 tarihleri arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarına gönderilen pnömoni lezyonlu 137 sığır akciğeri ve İstanbul Tuzla mezbahasında kesilen sığırlara ait pnömoni lezyonlu 63 akciğer (toplam 200 akciğer) örneği incelendi. Mezbahadan alınan örnekler aseptik olarak mikoplazma transport besiyeri içeren şişelere konuldu ve laboratuvara getirildi. (Miles ve Nicholas 1998). Akciğerlerinin alındığı hayvana ait yaş, cinsiyet ve geldiği bölge bilgileri mümkün olduğu durumlarda kaydedildi (Tablo 3-1).

3.1.2. Kültür

3.1.2.1. Besiyerlerinde Kullanılan Stok Solüsyonlar

Maya ekstraktı Solüsyonu (%25)

25 g maya ekstraktı (BD, 211929) 100 ml distile su içinde eritildi, 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek sterilize edildi ve -20 °C'de saklandı (Miles ve Nicholas 1998).

Talyum Asetat Solüsyonu (%10)

10 g talyum asetat (Sigma, T8266) 100 ml distile su içinde eritildi, 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek sterilize edildi ve +4 °C'de saklandı (Miles ve Nicholas 1998).

Penisilin G Solüsyonu (200.000 IU/ml)

1,25 g penisilin G (Applichem, A1837) 10 ml distile su içinde eritildi, 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek sterilize edildi ve +4 °C'de saklandı (Miles ve Nicholas 1998).

Tablo 3-1: Örneklerin alındığı hayvanlarla ilgili bilgiler

		Laboratuvara gelen	Mezbahadan alınan
Cinsiyet	Erkek	51	63
	Dişi	45	0
	Bilgi edinilemedi	41	0
	TOPLAM	137	63
Yaş	0-1 ay	9	0
	1-3 ay	37	0
	3-6 ay	9	0
	6-12 ay	41	0
	1-2 yaş	13	63
	Bilgi edinilemedi	28	0
	TOPLAM	137	63
İl	Balıkesir	50	0
	İstanbul	25	13
	Kocaeli	12	27
	Edirne	11	0
	Çanakkale	9	0
	Bursa	5	0
	Sakarya	5	23
	Kırklareli	4	0
	Adana	3	0
	Konya	3	0
	Tekirdağ	3	0
	Kars	2	0
	Sivas	2	0
	Aydın	1	0
	Van	1	0
	Yalova	1	0
	TOPLAM	137	63

Fenol Kırmızısı Solüsyonu (%1)

1 g fenol kırmızısı (Merck, 1.07241.0025) 100 ml distile su içinde eritildi, 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek sterilize edildi ve +4 °C'de saklandı (Miles ve Nicholas 1998).

Glikoz Solüsyonu (%50)

50 g glikoz (Sigma G8270) distile su içinde eritilerek 100 ml son hacime tamamlandı. 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek steril edildi ve +4 °C'de saklandı (Miles ve Nicholas 1998).

3.1.2.2. Besiyerleri

Mezbahadan alınan örneklerin taşınması için mikoplazma transport besiyeri kullanıldı (Miles ve Nicholas 1998). İlk ekim ve pasajlar için katı ve sıvı “modifiye Hayflick’s medium” (Whitford ve ark. 1999) kullanıldı.

Mikoplazma Transport Besiyeri

Kalp infüzyon broth (Fluka, 05121)	2,5 g
Distile su	70 ml
Maya ekstrakt solüsyonu (%25)	10 ml
At serumu (Life Technologies, 16050)	20 ml
Talyum asetat solüsyonu (%10)	0,2 ml
Penisilin G solüsyonu (200.000 IU/ml)	0,5 ml

Tüm malzemeler uygun miktarlarda tartıldı, distile su içerisinde eritildi ve homojen hale getirilen karışımın pH'sı 7,6'ya ayarlandı. Besiyeri 0,2 µm'lik selüloz asetat filtreden (Schleicher and Schuell, 10462200) süzülerek steril edildi ve +4 °C'de saklandı.

Sıvı Modifiye Hayflick’s Medium

Birinci Kısım:

PPLO broth (BD, 255420)	21 g
Distile su	1000 ml
Fenol kırmızısı solüsyonu (%1)	2 ml

Tüm malzemeler uygun miktarlarda tartıldı, distile su içerisinde eritildi ve karışımın pH'sı 7,4'e ayarladı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 20 dakika süreyle steril edildi ve 56 °C'ye soğutuldu.

İkinci Kısım:

Birinci kısım	75 ml
At serumu (Life Technologies, 16050)	15 ml
Maya ekstraktı solüsyonu (%25)	10 ml
Glikoz solüsyonu (%50)	0,2 ml
Penisilin G solüsyonu (200.000 IU/ml)	0,5 ml
Talyum asetat solüsyonu (%10)	0,2 ml

Kapaklı şişelere 9'ar ml paylaştırılan besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

Katı Modifiye Hayflick's Medium

Birinci Kısım:

PPLO broth (BD, 255420)	1,47 g
Distile su	70 ml
Purified agar (Oxoid, LP0028)	0,8 g

Tüm malzemeler uygun miktarlarda tartıldı, distile su içerisinde eritildi ve karışımın pH'sı 7,4'e ayarladı. Besiyeri otoklavda 121 °C'de 20 dakika süreyle steril edildi ve 56 °C'ye soğutulup ikinci kısım ilave edildi.

İkinci Kısım:

Birinci kısım	70 ml
At serumu (Life Technologies, 16050)	15 ml
Maya ekstraktı solüsyonu (%25)	10 ml
Glikoz solüsyonu (%50)	0,2 ml
Penisilin G solüsyonu (200.000 IU/ml)	0,5 ml
Talyum asetat solüsyonu (%10)	0,2 ml

Hazırlanan besiyeri petri kutularına dökülüp kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.1.3. Standart Suşlar

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarı suş koleksiyonunda bulunan *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (B103 Portekiz), *Mycoplasma bovis* (NCTC 10131), *Mycoplasma canis* (NCTC 10146), *Mycoplasma californicum* (NCTC 10189), *Mycoplasma alkalescens* (NCTC 10135), *Mycoplasma canadense* (NCTC 10152), *Mycoplasma bovirhinis* (NCTC 10118), *Mycoplasma leachii* (NCTC 10133), *Mycoplasma bovigenitalium* (NCTC 10122), *Mycoplasma arginini* (NCTC 10122) ve *Acholeplasma laidlawii* (NCTC 10116) standart suşları kullanıldı.

3.1.4. Moleküler Çalışmalar

3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Standart suşların ve çalışmada izole edilen mikoplazmaların DNA ekstraksiyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 11 796 828 001) kullanıldı.

DNA ekstraksiyon Kiti İçeriği:

Binding Buffer, Proteinaz K, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Filtreli tüp, Toplama tüpü.

3.1.4.2. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

16S rDNA PCR

Forward primer (GC-341F): 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG (IDT, Coralville, Iowa, ABD), Reverse primer (R543): 5'-ACC TAT GTA TTA CCG CG (IDT, Coralville, Iowa, ABD), 10x PCR buffer (Fermentas, EP0402), MgCl₂ (Fermentas, EP0402), dNTP karışımı (Fermentas, R0192), Taq DNA polimeraz (Fermentas, EP0402), Moleküler grade su (Multicell, 809-115-LL), pozitif kontrol olarak *Mycoplasma bovis*'ten ekstrakte edilmiş DNA kullanıldı.

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, A9539)	4 g
10X Tris-Borate-EDTA buffer (Sigma, T4415)	10 ml
Distile su	180 ml

Tüm malzemeler karıştırıldı ve mikrodalga fırında (Beko) eritildi, 60 °C'ye soğutuldu ve içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromür (Sigma, E1510) ilave edildi. Hazırlanan jel, tarakları uygun olarak yerleştirilmiş kalıp tepsisine döküldü. Katılaştığında 0,5X Tris-Borate-EDTA buffer (Sigma, T4415) doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirildi.

6 X yükleme solüsyonu (Fermentas, R0621), DNA marker (Fermentas, SM1273)

Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi

Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, ABD), Polyacrylamide (Merck, 8.00830.1000), Bis (Sigma, 146072), Üre (Sigma, U6504), Deiyonize formamid (Ambion, AM9342), TEMED (Sigma, T7024), Amonyum persülfat (Sigma, A3678), 50X Tris-Acetic Acid-EDTA buffer (Bio-Rad, 161-0773), 6X yükleme solüsyonu (Fermentas, R0621), 10.000X SYBR Gold (Life Technologies, S-11494) kullanıldı.

3.1.4.3. *M. bovis* Spesifik PCR

Forward primer (MBPol-6F): 5'-TAT CGA GCC TTT GAT GTC GTT TAC ACT A (IDT, Coralville, Iowa, ABD), Reverse primer (MBPol-8R): 5'-TAA TAT CAT CTG CTT TTG AAT GG (IDT, Coralville, Iowa, ABD), 10x PCR buffer (Fermentas, EP0402), MgCl₂ (Fermentas, EP0402), dATP (Fermentas, R0181), dTTP (Fermentas, R0181), dCTP (Fermentas, R0181), dGTP (Fermentas, R0181), Taq DNA polimeraz (Fermentas, EP0402), Moleküler grade su (Multicell, 809-115-LL). Pozitif kontrol olarak *Mycoplasma bovis*'ten ekstrakte edilmiş DNA.

3.1.5. Diğer Gereçler

UV transillüminatör (Wisd), Thermal cycler (Thermo), 1,5 ml kapaklı DNaz ve RNaz'dan arındırılmış mikrosantrifüj tüpleri (Axygen), Mikrosantrifüj (Hettich), 0,2 ml lik ince çeperli DNaz ve RNaz'dan arındırılmış PCR tüpleri (Greiner Bio-One), Otomatik mikropipet (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Thermo), DNaz, RNaz'dan arındırılmış filtreli pipet uçları (Greiner Bio-One), Vorteks (IKA), Agaroz jel elektroforez sistemi (Thermo), Güç kaynağı (Thermo), Absolut etil alkol (Appllichem, A3678), İsoopropanol (Sigma, 190764), PBS (Roche, 11666789001), Dijital fotoğraf makinesi (Olympus, OMD E-M10) kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kültür

Steril makas ve pens yardımıyla, akciğerlerin lezyonlu ve sağlam dokularının kesiştiği kısımlardan alınan yaklaşık 1 cm³ akciğer parçası, havanda steril kum ve sıvı besiyeri ilavesi ile ezildi. Elde edilen homojenizattan 9'ar ml modifiye Hayflick's sıvı besiyerinde 10⁻⁶'ya kadar on katlı dilüsyonları yapılarak ekimler gerçekleştirildi. Ayrıca Modifiye Hayflick's agarlar 6 eşit parçaya ayrıldı ve dilüsyonları yapılmış ekimlerden katı besiyerlerine damlatıldı. Sıvı ve katı kültürler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Mikoplazmalar üremeleri için gereksinim duydukları yüksek nemi sağlayabilmek amacıyla etüvün su haznesi tamamen dolduruldu. Katı ve sıvı kültürler üreme yönünden her gün kontrol edildi (Miles ve Nicholas 1998).

Modifiye Hayflick's agarlar stereo mikroskop ile sahanda yumurta görünümlü tipik koloniler yönünden incelendi. Tipik kolonilerin gözlendiği örnekler *Mycoplasma* sp./ *Acholeplasma* sp. şüpheli olarak değerlendirildi. Tek bir koloninin bulunduğu agar parçası öze yardımıyla kesilerek alınıp sıvı besiyerine aktarıldı. Katı besiyerine pasaj için agar blok yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bir koloninin bulunduğu agar parçası öze yardımıyla kesildi, katı besiyerinin üzerine ters çevrilerek konuldu ve dikkatli bir şekilde agarın yüzeyinde hareket ettirildi. Üreme görülmeyen katı besiyerleri 14 güne kadar inkübe edildi.

Sıvı kültürler üreme ve kontaminasyon yönünden gözle kontrol edildi. Sıvı kültürlerde hafif ve homojen bulanıklık mikoplazma üreme belirtisi olarak değerlendirildi ve bu şekilde üreme tespit edilen sıvı kültürlerden pipet ile hem sıvı besiyerine [%10 (v/v) ekim oranı] hem de katı besiyerine pasajlar yapıldı. Sıvı kültürlerde yoğun bulanıklık ve/veya dipte tortu şeklinde üremelerin gözlemlenmesi kontaminasyon olarak değerlendirildi. Bu kültürlerden 1 ml alınıp 0,45 µm por çaplı steril membran filtreden süzülerek 9 ml sıvı besiyerine ve 1 damla katı besiyerine pasajlandı.

Sıvı kültürlerin inkübasyonunda 5. güne kadar mikoplazma üreme belirtisi veya kontaminasyon görülmediği durumunda sıvı ve katı besiyerlerine kör pasaj yapıldı. Bunun için üreme saptanmayan şüpheli kültürlerden pipet ile 1 ml alınarak 9 ml sıvı besiyerine ve 1 damla katı besiyerine pasaj yapıldı. Eski sıvı kültürler kör pasajların yapıldığı yeni besiyerleri ile birlikte inkübe edilip 14 güne kadar takip edildi. İkinci ve

daha sonraki pasajlara ait tüm katı ve sıvı sub-kültürler ilk ekimlerde olduğu gibi %5 CO₂'li ve yüksek nemli ortamda 37 °C'de inkübe edildi. Üreme olmayan sıvı kültürlerden ard arda yapılan 3 kör pasajı takiben de üreme saptanmayan örnekler negatif olarak değerlendirildi.

Üreme belirtisi gözlenen sıvı kültürler agara pasajlanıp tipik koloniler görülerek doğrulandıktan sonra moleküler çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Katı besiyerinde üreme saptandığı durumlarda ise koloniler sıvı besiyerine pasajlanıp üretildikten sonra -20 °C'de saklandı.

Tüm standart mikoplazma suşları katı ve sıvı modifiye Hayflick's medium'a ekilip 37 °C'de %5 CO₂'li ve yüksek nemli koşullarda 3-5 gün inkübe edilerek üretildi.

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Standart suşların ve çalışmada izole edilen *Mycoplasma/ Acholeplasma* şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonu küçük değişikliklerle kit protokolüne göre yapıldı.

- 1- 1 ml mikoplazma kültürü maksimum hızda 10 dakika santrifüj edildi, üst sıvı atıldı ve dipteki tortu 200 µl PBS ile tekrar sulandırıldı.
- 2- Süspansiyona 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K ilave edilerek karıştırıldı ve 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 3- Karışıma 100 µl isopropanol eklendi.
- 4- Filtreli tüp, toplama tüpünün içine yerleştirildi ve yukarıda hazırlanan karışım filtreli tüp içerisine aktarıldı. Tüpler 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 5- Filtreli tüpe 500 µl Inhibitor Removal Buffer konularak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü tekrar atılarak filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 6- Yıkama işlemi için filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer konularak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Wash Buffer ile yıkama işlemi aynı şekilde bir kez daha tekrar edildi.

- 7- Toplama tüpü tekrar atılarak filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 10 saniye maksimum hızda santrifüj edildi. Toplama tüpü atılarak filtreli tüp temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 8- Filtreli tüpe 200 µl önceden 70°C'ye ısıtılmış Elution Buffer konularak 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpündeki DNA, moleküler çalışmalarda hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.2.2. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi ile İdentifikasyon

Standart suşlar ve çalışmada izole edilen *Mycoplasma/ Acholeplasma* şüpheli izolatlara 16S rDNA PCR/DGGE uygulandı. Bu metot ile ilk aşamada 16S rDNA geninin yaklaşık 200 bp'lik bir kısmı mikoplazma spesifik perimer çifti ile çoğaltılmış, ikinci aşamada DNA amplifikasyonunu doğrulama amacıyla PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılmış, üçüncü aşamada da denatüre edici gradient jel elektroforezi tekniği yardımıyla birinci aşamada elde edilen PCR ürününün baz dizilerine göre ayrılması sağlanarak tür seviyesinde identifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için, her bir izolatın DGGE bant profili, standart suşların bant profilleri ile karşılaştırılmıştır (McAuliffe ve ark. 2005).

DNA Amplifikasyonu

16S rDNA'nın PCR ile amplifikasyonu küçük değişikliklerle McAuliffe ve ark. (2005)'in yöntemine göre yapıldı.

Primerlerin 20 pmol/µl'lik solüsyonlarını hazırlamak için forward primer 2330 µl ve reverse primer 4015 µl moleküler grade su ile sulandırıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Ekstrakte edilmiş DNA'dan 5 µl, 45 µl reaksiyon karışımına (1x PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM her bir dNTP'den, 0,5 µM her bir primerden ve 1U Taq DNA polimeraz) ilave edildi ve PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirildi. 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben; 30 siklus olarak 95 °C'de 1 dakika, 56 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika amplifikasyon ve son olarak 72 °C'de 10 dakika son sentez aşamaları gerçekleştirildi.

Agaroz Jel Elektforezi

Amplifikasyonun doğrulanması amacıyla 10 µl PCR ürünü, 2 µl 6x yükleme solüsyonu ile karıştırılarak agaroz jele yüklendi. Örnekler, pozitif kontrol, negatif kontrol ve DNA marker ile paralel olarak yürütüldü. Jele 5 Volt/cm doğru akım uygulanarak 1 saat elektroforeze tabi tutuldu. Agaroz jel UV transillüminatörde incelendi ve görüntü dijital fotoğraf makinesiyle kaydedildi.

Elektroforez sonucunda pozitif kontrolde 240 bp spesifik bandın oluşumu, negatif kontrolde ise bandın olmaması yapılan PCR testinin doğruluğunu gösterdi. Elektroforez sonucunda 240 bp'lik bant elde edilerek amplifikasyonun gerçekleştiği doğrulanan PCR ürünleri, DGGE ile test edildi.

Denatüre Edici Gradient Jel Elektforezi

Universal Mutation Detection System kullanılarak denatüre edici gradient (%30-%60) içeren %10 polyacrylamide/bis (37,5:1) karışımı hazırlandı (%100 denatüre edici karışım: 7 M üre ve %40 deiyonize formamid). Polimerizasyon %0,1 TEMED ve %0,1 amonyum persülfat ile sağlandı. Yürütme tamponu olarak 1x TAE buffer kullanıldı. Yükleme solüsyonu (6x) ile karıştırılan PCR ürünlerinden 20 µl jele yüklendi. Polyacrylamide/bis jele 100 Volt doğru akım uygulanarak 60 °C'de 18 saat elektroforeze tabi tutuldu. Jel 1x TAE buffer içinde 1x SYBR Gold ile 15 dakika boyanarak UV transillüminatörde incelendi ve görüntü dijital fotoğraf makinesiyle kaydedildi. Her bir izolat için elde edilen DGGE bant profili standart suşlar ile karşılaştırılarak tür bazında identifikasyonları gerçekleştirildi (McAuliffe ve ark. 2005).

3.2.2.3. *M. bovis* Spesifik PCR

DNA Amplifikasyonu

Çalışmada izole edilen *Mycoplasma/ Acholeplasma* türlerine ve pozitif kontrol olarak *M. bovis* standart suşuna *M. bovis* spesifik PCR uygulandı.

Primerlerin 20 pmol/µl'lik solüsyonlarını hazırlamak için forward primer 5315 µl ve reverse primer 4300 µl moleküler grade su ile sulandırıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. 30 mM dATP, 30 mM dTTP, 15 mM dCTP ve 15 mM dGTP içeren dNTP karışımı hazırlamak için 20 µl moleküler grade suya 60 µl dATP, 60 µl dATP, 30 µl dCTP ve 30 µl dGTP ilave edilip karıştırıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Ekstrakte edilmiş DNA'dan 5 µl, 45 µl reaksiyon karışımına (1x PCR buffer,

1,5 mM MgCl₂, 0,3 mM dATP, 0,3 mM dTTP, 0,15 mM dCTP, 0,15 mM dGTP, 0,4 µM her bir primerden ve 2,5 U Taq DNA polimeraz) ilave edildi ve PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirildi. 94 °C'de 2 dakika ön denatürasyonu takiben; 30 siklus olarak 94 °C'de 30 saniye, 49 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 30 saniye amplifikasyon ve son olarak 72 °C'de 5 dakika son sentez aşamaları gerçekleştirildi (Marenda ve ark. 2005).

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz Jel Elektroforezi 16S rDNA PCR'da olduğu şekilde gerçekleştirildi. Elektroforez sonucunda pozitif kontrolde 265 bp spesifik bandın oluşumu, negatif kontrolde ise bandın olmaması yapılan PCR testinin doğruluğunu gösterdi. Şüpheli izolatların pozitif olarak değerlendirilmesi 265 bp'lik DNA bandının varlığına göre yapıldı.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

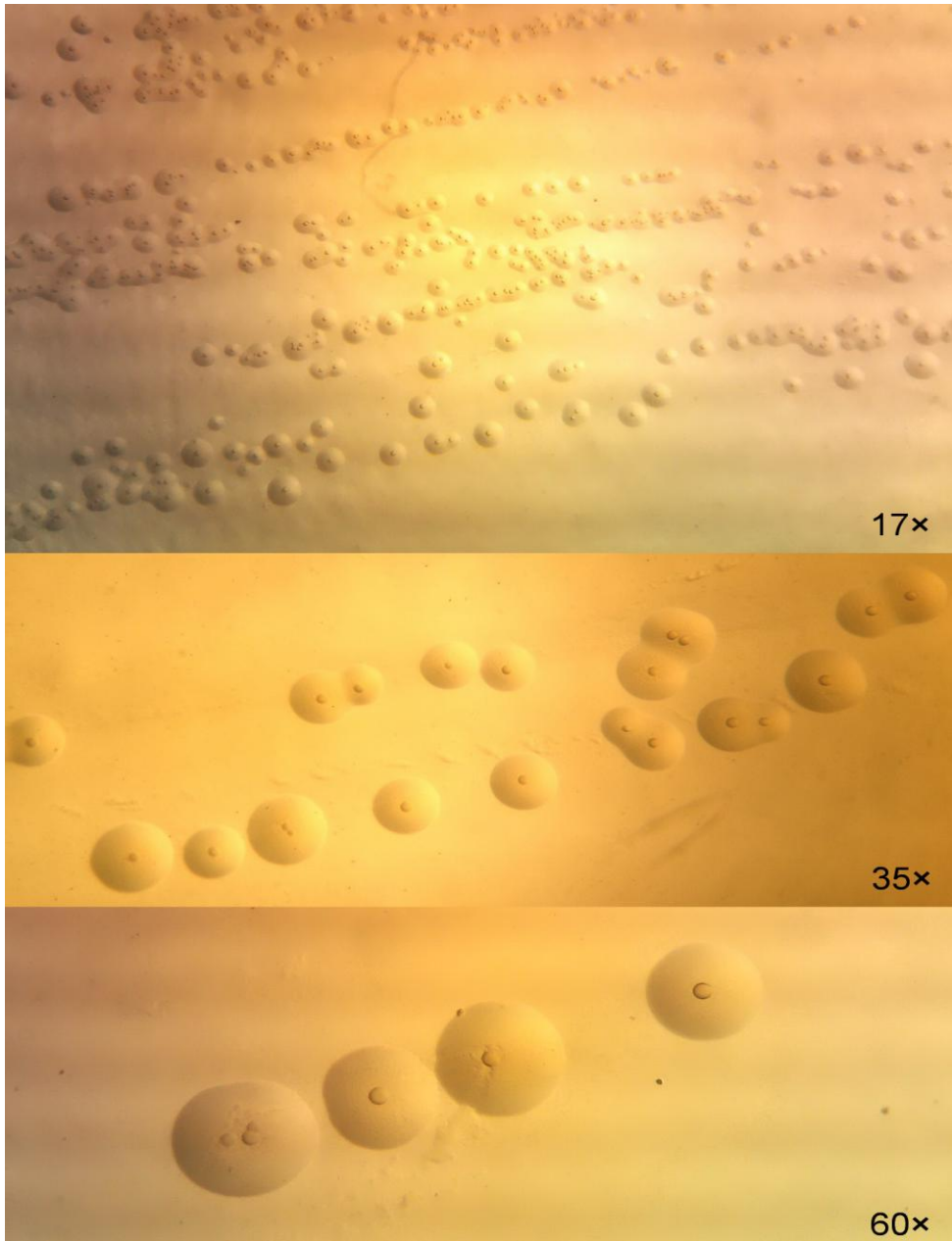
M. bovis spesifik PCR sonuçları ile 16S rDNA PCR/DGGE sonuçları karşılaştırılarak 16S rDNA PCR/DGGE'nin *M. bovis* identifikasyonundaki relatif spesifite ve relatif sensitivitesi hesaplandı (Dohoo ve ark. 2003).

İstatistiksel analizlere mezbahada toplanan örneklerin alındığı hayvanlarının hepsinin erkek ve 1-2 yaş arasında olmasından dolayı, sadece laboratuvara akciğer örneği gönderilmiş olan *Mycoplasma* spp. şüpheli hayvanlar dahil edilmiştir. Analizler yapılırken cinsiyet ya da yaş bilgileri toplanabilmiş hayvanlar dahil edilerek; yaş ve cinsiyet ile *Mycoplasma* spp. izolasyonu arasındaki istatistiksel önem incelendi. Analizler SPSS versiyon 13.0 (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL) programı kullanılarak Pearson's Ki-kare testi ile gerçekleştirildi (Özdamar 1999).

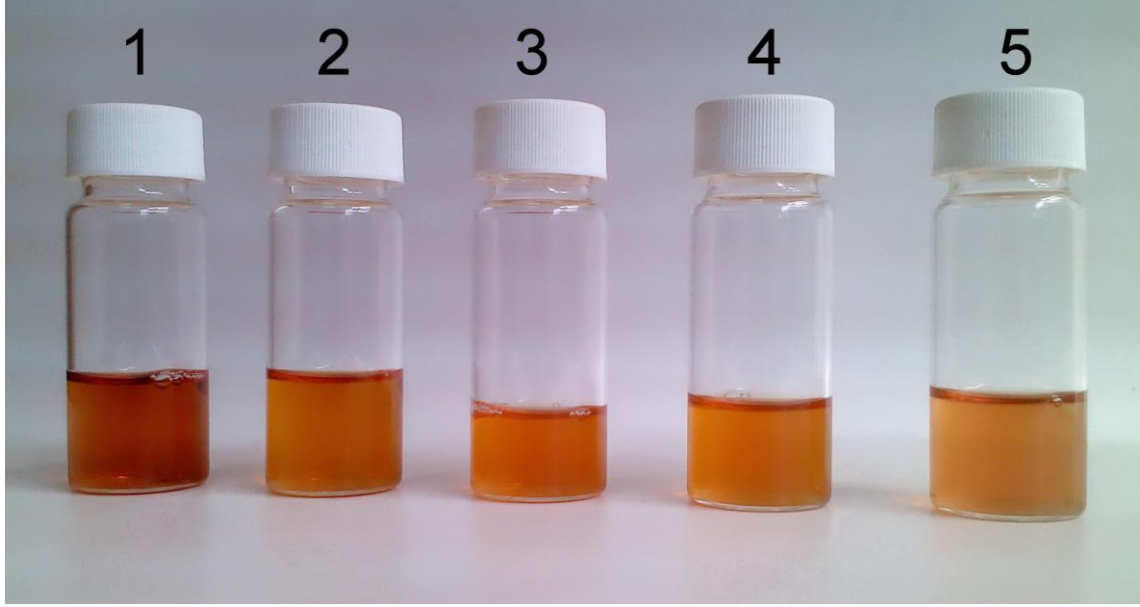
4. BULGULAR

4.1. Kültür

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans TeŖhis Laboratuvarına gelen pnömoni lezyonlu 137 sığır akciğerinin 100 (%72,99)'nden ve mezbahadan toplanan pnömoni lezyonlu 63 akciğerin 6 (%9,52)'sından *Mycoplasma/Acholeplasma* Ŗpheli koloniler izole edildi. Toplam olarak 200 pnömonili akciğerin 106 (%53,00)'sından Ŗpheli *Mycoplasma/Acholeplasma* spp. izolasyonu yapıldı (Ŗekil 4-1 ve 4-2).



Şekil 4-1: Katı kültürde mikoplazma şüpheli koloniler



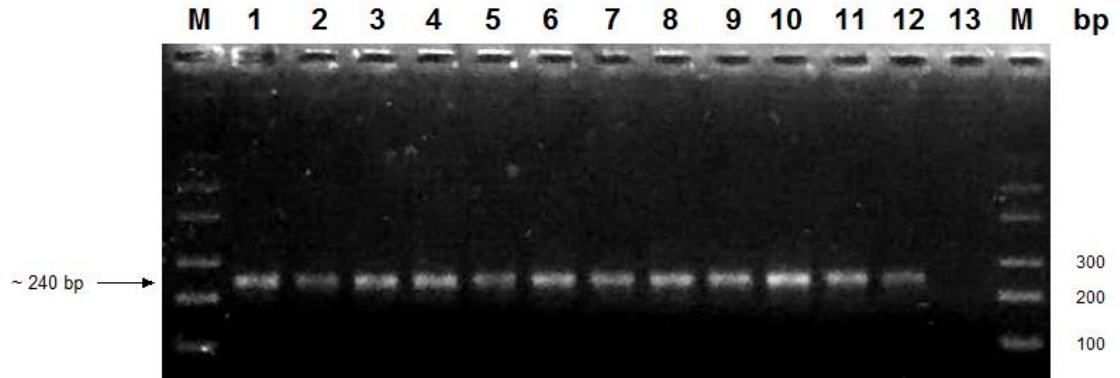
Şekil 4-2: Sıvı kültürler

1: Steril besiyeri, 2-5: *M. bovis*.

4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. 16S rDNA PCR ve Denatüre Edici Gradient Gel Elektroforezi

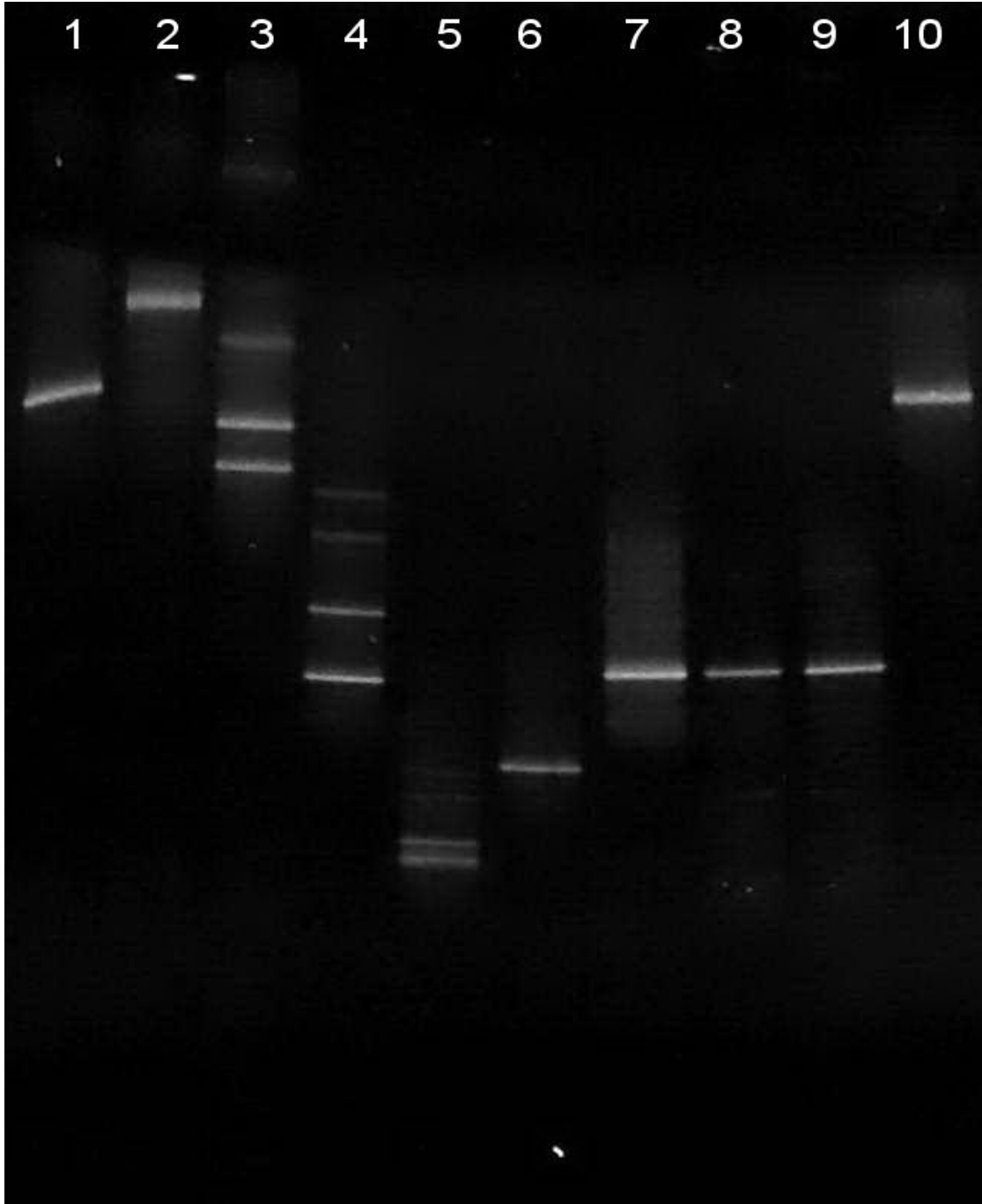
İlk aşama olan 16S rDNA PCR sonucunda toplam 106 izolatın tamamında 240 bp'lik spesifik bant elde edilerek amplifikasyon doğrulandı (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: 16S rDNA PCR

M: marker, 1-11: örnekler, 12: pozitif kontrol (*M. bovis*), 13: negatif kontrol (su).

PCR/DGGE ile identifikasyon sonucunda 100 adet *M. bovis*, 1 adet *M. arginini*, 1 adet *A. laidlawii* ve karışık kültür halinde 4 adet *M. bovis* + *M. arginini* tespit edildi. *MmmSC* ise tespit edilmedi (Şekil 4-4). Laboratuvara gelen ve mezbahadan alınan akciğerlerden yapılan izolasyonların cinsiyete, yaşa ve hayvanın geldiği ile göre oranları sırasıyla Tablo 4-1 ve 4-2’de verilmiştir.



Şekil 4-4: PCR/DGGE

1: *A. laidlawii*, 2: *M. bovirhinalium*, 3: *MmmSC*, 4: *M. bovirhinalis*, 5: *M. arginini*, 6: *M. alkaescens*, 7: *M. bovis*, 8, 9: *M. bovis* pozitif örnekler, 10: *A. laidlawii* pozitif örnek.

Tablo 4-1: Laboratuvara gelen örneklerden yapılan izolasyonların cinsiyete, yaşa ve hayvanın geldiği ile göre dağılımı

		Pozitif (%)
Cinsiyet	Erkek (n=51)	39 (%76,5)
	Dişi (n=45)	31 (%68,9)
	Bilgi edinilemedi (n=41)	30 (%73,2)
	TOPLAM (n=137)	100 (%73,0)
Yaş	0-1 ay (n=9)	6 (%66,7)
	1-3 ay (n=37)	30 (%81,1)
	3-6 ay (n=9)	7 (%77,8)
	6-12 ay (n=41)	30 (%73,2)
	1-2 yaş (n=13)	8 (%61,5)
	Bilgi edinilemedi (n=28)	19 (%67,9)
	TOPLAM (n=137)	100 (%73,0)
İl	Balıkesir (n=50)	42 (%84,0)
	İstanbul (n= 25)	13(%52,0)
	Kocaeli (n=12)	9 (%75,0)
	Edirne (n=11)	7 (%63,6)
	Çanakkale (n=9)	8 (%88,9)
	Bursa (n=5)	4 (%80,0)
	Sakarya (n=5)	3 (%60,0)
	Kırklareli (n=4)	3 (%75,0)
	Adana (n=3)	3 (%100,0)
	Konya (n=3)	1 (%33,3)
	Tekirdağ (n=3)	2 (%66,7)
	Kars (n=2)	2 (%100,0)
	Sivas (n=2)	1 (%50,0)
	Aydın (n=1)	1 (%100,0)
	Van (n=1)	1 (%100,0)
	Yalova (n=1)	0 (%0,0)
	TOPLAM (n=137)	100 (%73,0)

Tablo 4-2: Mezbahadan alınan örneklerden yapılan izolasyonların cinsiyete, yaşa ve hayvanın geldiği ile göre dağılımı

		Pozitif (%)
Cinsiyet	Erkek (n=63)	6 (%9,52)
	Dişi (n=0)	-
	TOPLAM (n=63)	6 (%9,52)
Yaş	0-1 yaş (n=0)	-
	1-2 yaş (n=63)	6 (%9,52)
	TOPLAM (n=63)	6 (%9,52)
İl	İstanbul (n= 13)	1 (%7,7)
	Kocaeli (n=27)	2 (%7,4)
	Sakarya (n=23)	3 (%13,0)
	TOPLAM (n=63)	6 (%9,52)

Saptanan türlerin sayıları ve tüm izolatlara oranları Tablo 4-3'te, türlerin pnömonili akciğerlerde bulunma oranları Tablo 4-4'te yer almaktadır.

Tablo 4-3: Saptanan türlerin sayıları ve tüm izolatlara oranları

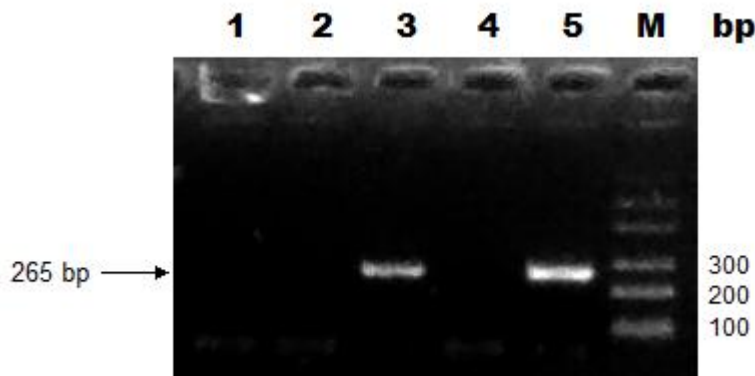
Materyalin Kaynağı	<i>M. bovis</i>		<i>M. arginini</i>		<i>A. laidlawii</i>		<i>M. bovis + M. arginini</i>		TOPLAM	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Laboratuvara gelen	94	94,00	1	1,00	1	1,00	4	4,00	100	100,00
Mezbaha	6	100,00	0	0	0	0	0	0	6	100,00
TOPLAM	100	94,34	1	0,94	1	0,94	4	3,77	106	99,99

Tablo 4-4: Türlerin pnömonili akciğerlerde bulunma oranları

Materyalin Kaynağı	<i>M. bovis</i> (%)	<i>M. arginini</i> (%)	<i>A. laidlawii</i> (%)	<i>M. bovis</i> + <i>M. arginini</i> (%)	TOPLAM (%)
Laboratuvara gelen (n=137)	68,61	0,73	0,73	2,92	72,99
Mezbaha (n=63)	9,52	0	0	0	9,52
TOPLAM (n= 200)	50,00	0,50	0,50	2,00	53,00

4.2.2. *M. bovis* Spesifik PCR

Laboratuvara gelen akciğerlere ait 100 izolatın 98 (%98,00)'i, mezbahadan toplanan akciğerlere ait 6 izolatın 6 (%100,00) 'sı, toplamda ise 106 izolatın 104 (%98,11)'ü *M. bovis* spesifik PCR ile pozitif bulundu (Şekil 4-5).

**Şekil 4-5: *M. bovis* spesifik PCR**

M: marker, 1, 2: negatif örnekler, 3: pozitif örnek 4: negatif kontrol (su) 5: pozitif kontrol (*M. bovis*).

4.3. İstatistiksel Analiz

16S rDNA PCR/DGGE'nin *M. bovis* identifikasyonunda relatif spesifitesi %100, relatif sensitivitesi %100 olarak hesaplandı.

Klinik örneklerde yaş ile infeksiyon arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişkinin olmadığı ($p>0,05$) belirlendi. Yine klinik örneklerde cinsiyet ile infeksiyon arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu ($p>0,05$) saptandı.

5. TARTIŞMA

Mikoplazmalar pek çok hayvan türünde, farklı organ ve sistemlerinde hastalıklara neden olur. Pnömoni, mastit, artrit, keratokonjuktivit, otit ve infertilite bunlardan bazıları olup hastalık yaptıkları dokularda ve vücut sıvılarında patojen mikoplazmaların yanı sıra bazen kommensal olan türler de bulunmaktadır (Tully ve Razin 1996). Mikoplazmaların spesifik olarak saptanması, günümüzde kullanılan mevcut tekniklerdeki yetersizlikler nedeniyle güçtür. Tanıda karşılaşılan en temel sorunlar, etkenlerin oldukça nazlı ve yavaş üremeleri, identifikasyon amacıyla kullanılan testlerin uzun zaman alması, serolojik testlerin non-spesifik ve düşük duyarlılıklı olmalarıdır (Miles ve Nicholas 1998; Tardy ve ark. 2009). Mikoplazmaların identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal test teknikleri, hücre duvarlı bakteriler için kullanılanlardan farklıdır. İdentifikasyon amacıyla yapılan biyokimyasal testler hem çok fazla iş gücü gerektirmekte hem de 2-3 hafta gibi uzun bir sürede sonuçlanmaktadır (Aluotto ve ark. 1970). Bunun yanında, türlerin değişken biyokimyasal karakterleri nedeniyle, sonuçların, başka bir identifikasyon tekniği ile doğrulanması gerekebilir. İdentifikasyon amacıyla kullanılan diğer yöntem immunolojik testlerdir ki bunun için de test edilecek her bir tür için ayrı hiperimmün serum gerekmekte ve çapraz reaksiyonlarla karşılaşılabilir (Miles ve Nicholas 1998; Nicholas ve ark. 2008).

Bu güçlüklerin üstesinden gelmek için son yıllarda pek çok tür spesifik PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak, 100'ün çok üzerinde mikoplazma türünün bulunması nedeniyle hepsini tanımlayabilecek PCR testi bulunmamaktadır (Nicholas ve ark. 2008). Mevcut teşhis tekniklerindeki sorunları aşarak tanıda daha etkili sonuçlar elde edebilmek için son yıllarda 16S rDNA PCR/DGGE tekniği geliştirilmiştir (McAuliffe ve ark. 2005). Bu tez çalışmasında da kullanılmış olan PCR/DGGE yöntemi, kültürlerin tek bir test ile 2-3 günde identifikasyonuna olanak vermektedir. DGGE, mikrobiyel ekolojide çeşitlilik analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir moleküler parmak izi yöntemidir (Muyzer 1999). Teorik olarak DNA'daki tek baz mutasyonlarını tespit edebilecek hassasiyettedir (Cotton ve ark. 1999). Bu çalışmada kullanılan 16S rDNA PCR/DGGE metodu mikoplazma teşhisinde kullanılan geleneksel yöntemlere göre önemli avantajlara sahip olduğu vurgulanmaktadır (Nicholas ve ark. 2008). Bu avantajlardan biri, yakın ilişkili olmaları nedeniyle konvansiyonel bakteriyolojik

yöntemlerle ve serolojik olarak ayırt edilmeleri zor olan türleri başarılı bir şekilde ayırt edebilmesidir (McAuliffe ve ark. 2005). Örneğin, bu çalışmada da yüksek oranda saptanmış olan *M. bovis*; kültür, serolojik testler ve hatta bazı PCR teknikleriyle *M. agalactiae* ile karışabilmektedir (McAuliffe ve ark. 2005). Chávez González ve ark. (1995) *M. bovis*'in moleküler teşhisi için geliştirdikleri PCR'ın, test ettikleri *M. agalactiae* suşları ile çapraz reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Tekniğin bir diğer avantajı, genel mikoplazma primerleri kullanıldığı için bilinmeyen ve bir konak için yeni mikoplazma türlerini de tespit etme potansiyeline sahip olmasıdır (Nicholas ve ark. 2008).

Ülkemizde *MmmSC*'nin varlığını araştıran çok az çalışma yapılmıştır. Erdağ ve Türkaslan (1994), Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen 750 kan serumunu CFT ve agar jel difüzyon testi ile incelenmiş ve hiçbir serumda pozitiflik saptamamışlardır. Erdenlig ve ark. (2009), CBPP tanısı için laboratuvara gönderilen 253 kan serumu örneğini serolojik olarak incelenmiş ve pozitiflik saptamamışlardır. Hastalığa ilişkin ülkemizde yapılan en kapsamlı çalışmada, Cetinkaya ve ark. (2003) tarafından Doğu Anadolu'daki dört farklı mezbahaya kesim için gelen 945 hayvan incelenmiştir. CFT ve cELISA ile sırasıyla 2 ve 4 serum örneği pozitif olarak bulunurken pnömonili olduğu gözlenip bakteriyolojik olarak incelenen 62 adet akciğer örneğinden *MmmSC* izole edilmemiştir. Ülgen ve ark. (1996), Bursa ilinden gelen akciğerlerde kültür ile *MmmSC*'yi izole etmişlerdir. OIE'nin veri tabanında (WAHIS) yer alan bilgilere göre, Türkiye tarafından CBPP'nin durumuna ilişkin resmi veri OIE'ye sunulmamış olduğundan ülkemizde hastalık durumu belirsiz olarak kabul edilmektedir (OIE 2013c). Hastalıktan arılığın OIE tarafından onaylanması için süurveyans yapılması zorunluluğu bulunmaktadır (OIE 2013c). İnfeksiyonun canlı hayvanlarda saptanması için mevcut teşhis yöntemlerinin yetersiz kalması nedeniyle mezbaha süurveyansı CBPP için en duyarlı süurveyans yöntemi olarak kabul edilmektedir (Cetinkaya ve ark. 2003). OIE tarafından da hastalıktan arılığın deklarasyonu için ülkelere mezbaha süurveyansı önerilmektedir (OIE 2013c). Bu çalışmada 63'ü mezbaha örneği olmak üzere 200 pnömonili akciğer incelendi ve hiçbir örnekte *MmmSC* tespit edilmedi. Ancak, ülkemizin arilik durumu halen resmi olarak açıklığa kavuşmuş değildir.

Bu çalışmada Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarına gönderilen pnömoni lezyonlu 137 sığır akciğerinin 100 (%72,99)'ünden

mikoplazma izole edildi. PCR/DGGE ile bunların 94'ü *M. bovis*, 1'i *M. arginini*, 1'i *A. laidlawii* ve 4'ü *M. bovis* + *M. arginini* olarak identifiye edildi. Mezbahadan toplanan 63 akciğer örneğinin ise 6 (%9,52)'sından mikoplazma izole edildi ve izolatların tamamı *M. bovis* olarak identifiye edildi. *M. bovis* izolasyon oranının laboratuvara getirilen akciğerlerde mezbahadan alınanlara göre daha yüksek olması, örneklerin sürü problemi oluşturan, tedaviye iyi yanıt vermeyen direkt mikoplazma şüpheli olguların görüldüğü hayvanlara ait akciğerler olması ve akciğerlerin çoğunlukla şiddetli pnömonik lezyon içermesiyle açıklanabilir. Viral etkenlere karşı aşılama ile kontrol altına alınamayan, zaman içerisinde prognozu iyiye gitmeyen ve yoğun antibiyotik tedavisine rağmen inatçılık gösteren vakalar muhtemel mikoplazma vakaları olarak tanımlanır ki bu çalışmada laboratuvara gönderilen örneklerde de bu tip klinik bulgular gözlemlenmekteydi. Mezbahadan alınan akciğerlerdeki nispeten düşük gerçekleşen izolasyon oranının ise bu akciğerlerin klinik semptom göstermeyen sığırlara ait olması ve ancak mezbahada örnek toplama esnasında fark edilen hafif vakalar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim mezbahadan toplanan akciğerlerin neredeyse tamamının hafif lezyonlu oldukları gözlenmiştir.

Yurt dışında yapılan çok sayıdaki çalışmada da klinik örneklerde *M. bovis* değişik oranlarda tespit edilmiştir. Arcangioli ve ark. (2008)'in Fransa'da gerçekleştirdiği çalışmada sığırların solunum sisteminden %80 oranında *M. bovis* izole edilmiştir. Thomas ve ark. (2002a) Belçika'da klinik bulgu gösteren sığırların solunum sistemine ait örneklerinden %31,5 oranında, Ayling ve ark. (2004) İngiltere'de laboratuvara gönderilen klinik örneklerde %52 oranında, Blackburn ve ark. (2007) Kuzey İrlanda'da pnömonili buzağı akciğerlerinde %21,2 oranında *M. bovis* tespit etmişlerdir. Ülkemizde, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Mycoplasma Referans Teşhis Laboratuvarına gönderilen pnömonili akciğerlerde yüksek *M. bovis* izolasyon oranı daha önce de rapor edilmiştir. Özdemir ve ark.'ın 2009 yılında gerçekleştirdiği çalışmada ülkemizin değişik bölgelerinden gelen 43 buzağıya ait pnömonili akciğerler bakteriyolojik olarak incelenmiş ve tamamından (%100) *M. bovis* izole edilmiştir (Özdemir ve ark. 2009). Yine aynı laboratuvara gelen materyaller kullanılarak yapılan başka bir çalışmada 75 akciğer örneğinin 31 (%41,3)'ünden *M. bovis* izole edilmiştir (Özdemir ve Türkyılmaz 2008). Ülkemizde klinik örnekler kullanılarak gerçekleştirilen iki çalışmada ise *M. bovis* göreceli olarak düşük oranda saptanmıştır. Karahan ve ark. (2010) Doğu Anadolu Bölgesinde klinik bulgu gösteren 54 sığırdan alınan solunum

sistemi örneklerinin 15 (%27,8)'inden *M. bovis* izole etmişlerdir. Akan ve ark. (2014) ise Türkiye'nin genelinden gelen solunum sistemi hastalığı belirtileri gösteren sığırlara ait 127 trakeal svabın 16 (%12,6)'sında direkt PCR ile *M. bovis* saptamışlardır. Ancak, söz konusu çalışmada aynı hayvanlara ait serumların 45 (%35,4)'i ELISA ile *M. bovis* pozitif bulunmuştur. Günümüzde *M. bovis*'in tüm dünyadaki sığırlarda bulunduğu bilinmektedir (Nicholas ve Ayling 2003). Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar ve son olarak bu tez çalışması ile elde edilen sonuçların ışığında *M. bovis*'in gerek Marmara Bölgesinde gerekse Türkiye genelindeki sığırların solunum sistemlerinde yaygın olarak bulunduğu ortaya konulmuştur.

Yabancı kaynaklara bakıldığında, mezbaha örneklerinde *M. bovis*'in araştırıldığı çalışma sayısı daha sınırlıdır. Radaelli ve ark. (2008) İtalya'da mezbahadan toplanan pnömonili akciğerlerinin %14'ünde bakteriyolojik olarak *M. bovis* tespit etmişlerdir. Ahmad ve ark. (2014) Pakistan'daki mezbahalardan alınan sığır akciğerleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada %9 oranında *M. bovis* saptamışlardır. Genel olarak incelendiğinde yabancı ülkelerdeki çalışmalarda da mezbaha kaynaklı örneklerdeki izolasyon oranlarının, bu tez çalışmasındaki bulguları destekler şekilde klinik örneklerdeki oranlardan daha düşük olduğu dikkati çekmektedir. Ülkemizde mezbahadan toplanan akciğer örnekleri ile yapılan araştırmalarda *Mycoplasma* sp. %12,9 - %25,7 arasında ve *M. bovis* %1,6 - %25,0 oranları arasında saptanmıştır. Kars ilindeki mezbahalardan 2005-2007 yılları arasında alınan pnömonili akciğerlerden (n=100) hiç mikoplazma izolasyonu yapılamazken direkt PCR ile *Mycoplasma* sp. oranı %19 ve *M. bovis* oranı %4 olarak bulunmuştur (Özen ve ark. 2009). Ülkemizin Doğu bölgelerinde yer alan 4 mezbahadan toplanan pnömoni lezyonlu 62 akciğerin bakteriyolojik olarak incelendiği bir başka çalışmada 8 (%12,9) mikoplazma izolasyonu yapılmış ve bunlardan 1 (%1,6)'i *M. bovis* olarak tanımlanmıştır (Cetinkaya ve ark. 2003). Önat (2011) tarafından, çoğu Bursa ve çevresindeki mezbahalardan olmak üzere, toplanan 152 pnömonili akciğerlerde *Mycoplasma* sp. %25,7 ve *M. bovis* %25,0 oranlarında izole edilmiştir. Bu son çalışmada, mezbaha örneklerinden mikoplazma türlerinin araştırıldığı önceki çalışmalardan farklı olarak, hücre duvarlı bakteriler için de ekim yapılmış ve *M. bovis* izole edilen akciğerlerin %21'inden aynı zamanda diğer bakteriyel pnömoni etkenleri de izole edilmiştir. Önat'ın çalışmasındaki mikoplazma izolasyon oranının diğer bakteriyel etkenlerle predispozisyon nedeniyle artmış olabileceği düşünülmektedir.

Sığırlarda *M. bovis* pnömonileri buzağılar ve yaşlı yetişkinler dahil her yaşta görülmektedir (Maunsell ve ark. 2011). Ancak araştırmacılar yaş ile enfeksiyona direncin arttığını, o nedenle buzağılarda hastalığa daha sık rastlanıldığını da vurgulamaktadır (Maunsell ve Donovan 2009). Bu çalışmada da klinik örnekler ve mezbaha örnekleri birlikte değerlendirildiğinde literatürdeki verilerle uygun olarak etken 1 yaşa kadar olan hayvanların %76,0'ında, 1 yaştan büyük erişkinlerin ise %18,4'ünde tespit edilmiştir. *Mycoplasma* spp. şüphesi ile laboratuvara gönderilen örnekler göz önünde bulundurulduğunda yaş grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın bulunmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır.

Maunsell ve Donovan (2009) semptomların tipik olarak doğumdan 2 hafta sonra görülmeye başlandığını bildirmiştir. Ancak Stipkovits ve ark. (1992), 4 güne kadar yaştaki hayvanlarda hastalığı rapor etmiştir. Bu tez çalışmasında da 0-1 aylık hayvanlarda %66,7 gibi yüksek bir oranda enfeksiyon saptanmıştır.

Araştırmacılar, sığırların *M. bovis*'e bağlı solunum sistemi enfeksiyonunun genel olarak hem dişi hem de erkek hayvanların hastalığı olduğunu bildirmektedir (Maunsell ve ark. 2011). Ayrıca White ve ark. (2010), *M. bovis* izolasyon oranları açısından cinsiyetler arası fark bulunmadığını ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında ise dişi hayvanlarda %68,9 oranında *M. bovis* saptanırken erkeklerde oran %39,5 olarak bulunmuştur. Ancak düşük *M. bovis* izolasyon oranına (%9,52) sahip mezbahadan alınan hayvanların tamamının erkek olması çalışma genelinde erkeklerdeki *M. bovis* prevalansını düşürmektedir. Yalnızca klinik örnekler değerlendirildiğinde dişi hayvanlardaki oran (%68,9) ile erkeklerdeki oran (%76,5) daha önceki çalışmayı destekler şekilde uyumludur ve istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Evcil hayvanlarda mikoplazmaların bulaşma ve yayılmasıyla ilgili pek çok çalışma bulunsa da enfeksiyonların epidemiyolojik durumunu (prevalans/insidans) yansıtan çalışmalar ya hiç yoktur ya da az sayıda bölge için mevcuttur. Bunun sebebi kısmen teşhislerinin uzun sürmesi kısmen de mevcut testlerin spesifikite ve sensitivite açısından kısıtlılıklarıdır. Spesifik PCR testleri de sadece bir türü tespit ettiği için, inceleme örneklerinde bulunması olası tüm türler için çok sayıda PCR testi yapılması gerekmektedir ki bu durum pratikte uygulanması çok zordur. Bu nedenlerle, belli bir hayvan türünde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, genellikle minör ve istisnai türler

göz ardı edilerek en önemli bir veya birkaç tür üzerinde yapılmaktadır. Örneğin, bu çalışmanın da konusunu oluşturan sığır solunum sistemi mikoplazmaları ile ilgili çalışmalar çoğunlukla sadece *M. bovis* ve *MmmSC* tespitine yönelik tasarlanmakta, *M. bovis genitalium*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. leachii* ve diğerlerinin olası varlıkları göz ardı edilmektedir (Schnee ve ark. 2012). Son yıllardaki bilimsel çalışmalar (Pitcher ve Nicholas 2005) mikoplazma konak spesifitesinin zannedildiği kadar sıkı olmadığını ve araştırmaların daha kapsamlı tasarlanmasının gerektiğini göstermiştir. Bu çalışmada da PCR/DGGE yöntemi ile laboratuvara gönderilen 137 örneğin 5'inden *M. arginini* (4'ünde *M. bovis* ile birlikte) ve 1'inden *A. laidlawii* izole edilmiştir.

M. arginini ve *A. laidlawii* doğada yaygın olarak bulunan ve pek çok hayvan türünün çok çeşitli dokularından izole edilen türlerdir (Krieg ve ark. 2010). Genel olarak apatojen kabul edilen bu türlerin laboratuvar tanısı açısından önemi, karışık kültürlerde daha hızlı üreyerek patojen türün saptanmasını zorlaştırmalarıdır (McAuliffe ve ark. 2005). Karışık mikoplazma kültürlerinin klasik bakteriyolojik yöntemlerle saptanması, mikoplazma kolonilerinin türler arasında diğer bakterilerde olduğu gibi belirgin morfolojik farklılık göstermemesi ve identifikasyon için saf kültür elde etmek amacıyla genellikle tek bir koloninin seçilmesi nedeniyle zordur. Ayrıca nispeten hızlı üreyen tür diğerini baskılayabilmektedir (McAuliffe ve ark. 2005). Son yıllarda yapılan farklı çalışmalarda çeşitli oranlarda çoklu enfeksiyon bildirilmiştir. Schnee ve ark. (2012) 60 saha örneği ile gerçekleştirdikleri çalışmada; mikoplazmalar için geliştirdikleri DNA mikroçip testi ile örneklerin 21 (%35)' inde, PCR/DGGE testi ile örneklerin 9 (%15)'unda çoklu mikoplazma türü tespit etmişlerdir. Chazel ve ark. (2010), 2003-2008 yılları arasında Fransa'da sığırlardan bakteriyolojik olarak izole edilen 1061 mikoplazmanın %12'sinin karışık mikoplazma kültürü halinde olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada *M. bovis* başlıca *M. bovirhinis* ve *M. arginini* ile miks enfeksiyon halinde tespit edilmiştir. McAuliffe ve ark. (2005) saha örneklerinden PCR/DGGE testi ile *M. bovirhinis* + *M. alkalescens*, *M. ovipneumoniae* + *M. arginini*, *M. ovipneumoniae* + *M. conjunctivae* ve *M. conjunctivae* + *M. arginini*'yi içeren çoklu enfeksiyonlar saptamışlardır. Akwuobu ve ark. (2014), Nijerya'da gerçekleştirdikleri çalışmalarında 131 saha izolatını PCR/DGGE ile identifiye etmiş ve 4 (%3,1) kültürde birden fazla mikoplazma tespit etmişlerdir. Görüldüğü gibi son yıllarda geliştirilen PCR/DGGE gibi jenerik moleküler yöntemler sayesinde, geçmişte düşük oranda

saptanan karışık mikoplazma kültürlerinin saptanma oranlarında da artışlar olmuştur. Bu çalışmada ise daha önceki çalışmalara paralel olarak PCR/DGGE ile 4 *M. bovis* izolatının *M. arginini* ile karışık olduğu saptanmıştır. Çoklu mikoplazma infeksiyonlarının artan oranda tespiti, örneklerde birden fazla mikoplazmanın varlığının nadir bir olay olmadığını göstermektedir. Yeni farkedilen bu durumun tedavi ve korunmaya etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada toplam 200 pnömonili akciğerden yapılan 104 *M. bovis* (%52,00) izolasyonu ülkemizde ve özellikle Marmara Bölgesinde sığırlarda *M. bovis*'in yaygın bir şekilde bulunduğunu göstermektedir. Sığırlarda pnömoni vakalarında çoğunlukla akla gelmeyen bu etkenin rutin bakteriyolojik testlerle birlikte laboratuvar muayenesine dahil edilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir. Zira *M. bovis*'in de dahil olduğu ya da tek başına sorumlu olduğu pnömonilerde, BRD tedavisinde yaygın olarak kullanılan penisilin ve sefalosporin grubu antibiyotikler etkisiz olacaktır. Ayrıca bu çalışma ile; izole edilen 106 mikoplazma türünün hepsinin identifikasyonu PCR/DGGE ile başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve tekniğin *M. bovis* identifikasyonunda relatif spesifitesi (%100) ve relatif sensitivitesinin (%100) yüksek olduğu ortaya konulmuştur. PCR/DGGE'nin veteriner teşhis laboratuvarlarında sığır akciğerinden izole edilen mikoplazmaların hızlı ve doğru teşhisinde rutin kullanım için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, Z., Babar, S., Abbas, F., Awan, M. A., Shafee, M., Tariq, M. M. ve Ali, M. (2014). Prevalence of *Mycoplasma bovis* in Respiratory Tract of Cattle Slaughtered in Balochistan, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(1), 46-49.
- Aiello, S.E. ve Moses, M.A. (2013). *The Merck Veterinary Manual Online*. Erişim 23.07.2014, The Merck Veterinary Manual: <http://www.merckmanuals.com/vet/>
- Akan, M., Babacan, O., Torun, E., Mustak, H. K. ve Oncel, T. (2014). Diagnosis of *Mycoplasma bovis* Infection in Cattle by ELISA and PCR. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 249-252.
- Akwuobu, C. A., Ayling, R. D., Chah, K. F. ve Oboegbulem, S. I. (2014). Studies into the prevalence of *Mycoplasma* species in small ruminants in Benue State, North-central Nigeria. *Tropical animal health and production*, 1-6.
- Aliyu, M. M., Obi, T. U. ve Egwu, G. O. (2000). Prevalence of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in northern Nigeria. *Preventive veterinary medicine*, 47(4), 263-269.
- Aluotto, B. B., Wittler, R. G., Williams, C. O. ve Faber, J. E. (1970). Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20(1), 35-58.
- Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H. ve Eddy, R.G. (2004). *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle* (2nd ed.). Oxford, UK: Blackwell Science/Iowa State Press.
- Anon. (2001). *Diagnostic Tests for Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP)*. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Erişim 19.06.2014, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scsh/out63_en.pdf
- Anon. (2002). *Recognizing Contagious Bovine Pleuropneumonia* (Rev. ed.). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Anon. (2008). *Foreign Animal Diseases* (7th ed.). Boca Raton: Boca Publications Group.
- Arcangioli, M. A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bézille, P., Poumarat, F. ve Le Grand, D. (2008). The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *The Veterinary Journal*, 177(1), 89-93.

- Atkin, C. L., Wei, S. ve Cole, B. C. (1994). The *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM: purification and identification of an active peptide. *Infection and immunity*, 62(12), 5367-5375.
- Ayling, R. D., Baker, S. E., Peek, M. L., Simon, A. J. ve Nicholas, R. A. (2000). Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *The Veterinary Record*, 146(26), 745-747.
- Ayling, R. D., Bashiruddin, S. E. ve Nicholas, R. A. (2004). *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *The Veterinary Record*, 155(14), 413-416.
- Baseman, J. B. ve Tully, J. G. (1997). *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging infectious diseases*, 3(1), 21.
- Bennett, R. H. ve Jasper, D. E. (1977). Bovine mycoplasma mastitis from intramammary inoculation of small numbers of *Mycoplasma bovis*. I. Microbiology and pathology. *Veterinary Microbiology*, 2(4), 341-355.
- Bennett, R. H. ve Jasper, D. E. (1977). Nasal prevalence of *Mycoplasma bovis* and IHA titers in young dairy animals. *The Cornell veterinarian*, 67(3), 361-373.
- Blackburn, P., Brooks, C., McConnell, W. ve Ball, H. J. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from cattle in Northern Ireland from 1999 to 2005. *Veterinary Record*, 161(13), 452-453.
- Brank, M., Le Grand, D., Poumarat, F., Bezille, P., Rosengarten, R. ve Citti, C. (1999). Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 6(6), 861-867.
- Brown, D. R., Whitcomb, R. F. ve Bradbury, J. M. (2007). Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(11), 2703-2719.
- Bruderer, U., Regalla, J., Abdo, E. M., Huebschle, O. J. ve Frey, J. (2002). Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary microbiology*, 84(3), 195-205.

- Cai, H. Y., Bell-Rogers, P., Parker, L. ve Prescott, J. F. (2005). Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 17(6), 537-545.
- Caswell, J. L. ve Archambault, M. (2007). *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8(02), 161-186.
- Caswell, J. L., Bateman, K. G., Cai, H. Y. ve Castillo-Alcala, F. (2010). *Mycoplasma bovis* in Respiratory Disease of Feedlot Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(2), 365-379.
- Cetinkaya, B., Ongor, H., Karahan, H. K., Lorenzon, S. ve Thiaucourt, F. (2003). Abattoir-based survey of contagious bovine pleuropneumonia in cattle in Turkey. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156, 1778-1781.
- Chávez González, Y. R., Bascuñana, C. R., Bölske, G., Mattsson, J. G., Molina, C. F. ve Johansson, K. E. (1995). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Veterinary microbiology*, 47(1), 183-190.
- Chazel, M., Tardy, F., Le Grand, D., Calavas, D. ve Poumarat, F. (2010). Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC veterinary research*, 6(1), 32.
- Citti, C. ve Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in microbiology*, 21(4), 196-203.
- Cotton, R.G.H., Edkins, E. ve Forrest, S. (1999). *Mutation Detection*. New York: Oxford University Press.
- Çetinkaya, B., Karahan, B., Kalın, R. ve Atıl, E. (2008). *Biodiversity of Ruminant Mycoplasmas in Eastern Turkey: Application for Vaccines and Control Strategies*. Erişim 13.07.2014, TÜBİTAK (PIA-553): http://uvt.ulakbim.gov.tr/uvt/index.php?cwid=9&vtadi=TPRJ&ano=102010_1d70b0026b6db017eeb302114179a371
- Dohoo, I., Martin, S. ve Stryhn, H. (2003). *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, P.E.I.: AVC.
- Dybvig, K. ve Voelker, L. L. (1996). Molecular biology of mycoplasmas. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 25-57.
- Egwu, G. O., Nicholas, R. A. J., Ameh, J. A. ve Bashiruddin, J. B. (1996). Contagious bovine pleuropneumonia: an update. *Veterinary Bulletin*, 66(9), 875-888.

- Erdağ, O. ve Türkaslan, J. (1994). Investigation of contagious bovine pleuropneumonia by the serological tests. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 25,49-53.
- Erdenlig, S., Özdemir, U., İyisan, A.S. ve Nicholas, R.A.J. (2009). The evaluation of humoral immune response to contagious bovine pleuropneumonia in cattle with respiratory disorders by western blot technique. *İçinde Mycoplasmaology - a review of developments over the last decade Gran Canaria*. Canary Islands, Spain, 10 -12th June 2009.
- Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. ve Dworkin, M. (2006). *The Prokaryotes* (3rd ed., Vol. 4). New York: Springer.
- Fischer, S. G. ve Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(6), 1579-1583.
- Francoz, D., Fortin, M., Fecteau, G. ve Messier, S. (2005). Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary microbiology*, 105(1), 57-64.
- Frey, J., Subramaniam, S., Bergonier, D. ve Nicolet, J. (1999). DNA repair genes uvrC as genetic targets for discrimination of closely related mycoplasmas. *İçinde L. Stipkovits, R., Rosengarten, J., Frey (Ed.), Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics* (Vol. 3). Brussels: European Commission; 40-43.
- Ghadersohi, A., Fayazi, Z. ve Hirst, R. G. (2005). Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Veterinary immunology and immunopathology*, 104(3), 183-193.
- GKGM (2013). *Hayvan Hastalık ve Zararlılarıyla Mücadele Programı*. Ankara: T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.
- Gorton, T. S., Barnett, M. M., Gull, T., French, R. A., Lu, Z., Kutish, G. F. ve Geary, S. J. (2005). Development of real-time diagnostic assays specific for *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Small Colony. *Veterinary microbiology*, 111(1), 51-58.
- Haines, D. M., Martin, K. M., Clark, E. G., Jim, G. K. ve Janzen, E. D. (2001). The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhea virus

- in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *The Canadian Veterinary Journal*, 42(11), 857.
- Hirsh, D.C., MacLachan, N.J. ve Walker, R.L. (2004). *Veterinary Microbiology* (2nd ed.). Iowa: Blacwell.
- Hotzel, H., Heller, M. ve Sachse, K. (1999). Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. *Molecular and cellular probes*, 13(3), 175-178.
- Hotzel, H., Sachse, K. ve Pfützner, H. (1996). Rapid detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples and nasal swabs using the polymerase chain reaction. *Journal of applied bacteriology*, 80(5), 505-510.
- Kannan, T. R. ve Baseman, J. B. (2006). ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6724-6729.
- Karahan, M., Kalin, R., Atil, E. ve Çetinkaya, B. (2010). Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. *The Veterinary record*, 166(26), 827.
- Krieg, N., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W. ve Whitman, W.B. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 4). New York: Springer.
- Lam, K. M. (2005). Chemotaxis in *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian diseases*, 49(1), 152-154.
- Le Grand, D., Saras, E., Blond, D., Solsona, M. ve Poumarat, F. (2004). Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. *Veterinary research*, 35(6), 635-649.
- Lorenzon, S., Arzul, I., Peyraud, A., Hendrikx, P. ve Thiaucourt, F. (2003). Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Veterinary microbiology*, 93(4), 319-333.
- Lorenzon, S., David, A., Nadew, M., Wesonga, H. ve Thiaucourt, F. (2000). Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Molecular and cellular probes*, 14(4), 205-210.
- Maniloff, J., Mcelhaney, R., Finch, L. ve Baseman, J. (1992). *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

- March, J. B., Clark, J. ve Brodlie, M. (2000). Characterization of Strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony Type Isolated from Recent Outbreaks of Contagious Bovine Pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: Evidence for a New Biotype. *Journal of clinical microbiology*, 38(4), 1419-1425.
- Marenda, M. S., Sagné, E., Poumarat, F. ve Citti, C. (2005). Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. *Microbiology*, 151(2), 475-489.
- Marobela-Raborokgwe, C., Nicholas, R., Ayling, R. ve Bashiruddin, J. B. (2003). Comparison of complement fixation test, immunoblotting, indirect ELISA, and competitive ELISA for detecting antibodies to *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony (SC) in naturally infected cattle from the 1995 outbreak in Botswana. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 70(1), 21-27.
- Masiga, W. N., Domenech, J. ve Windsor, R. S. (1996). Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), 1283-1308.
- Maunsell, F. P. ve Donovan, G. A. (2009). *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 139-177.
- Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J. ve Janzen, E. D. (2011). *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 772-783.
- McAuliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D. ve Nicholas, R. A. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of medical microbiology*, 54(8), 731-739.
- Miles, R. ve Nicholas, R. (1998). *Mycoplasma Protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Miserez, R., Pilloud, T., Cheng, X., Nicolet, J., Griot, C. ve Frey, J. (1997). Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Molecular and cellular probes*, 11(2), 103-111.
- Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), 317-322.
- Nagatomo, H., Takegahara, Y., Sonoda, T., Yamaguchi, A., Uemura, R., Hagiwara, S. ve Sueyoshi, M. (2001). Comparative studies of the persistence of animal

- mycoplasmas under different environmental conditions. *Veterinary microbiology*, 82(3), 223-232.
- Nicholas, R. A. J. ve Bashiruddin, J. B. (1995). *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (Small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the “ *Mycoplasma mycoides* cluster”. *Journal of comparative pathology*, 113(1), 1-27.
- Nicholas, R. A. J. ve Ayling, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis* : disease, diagnosis, and control. *Research in veterinary science*, 74(2), 105-112.
- Nicholas, R. A. J., Ayling, R. D., Woodger, N., Wessells, M. E. ve Houlihan, M. G. (2006). Mycoplasmas in adult cattle: Bugs worth bothering about?. *Irish Veterinary Journal*, 59(10), 301-304.
- Nicholas, R., Ayling, R. ve McAuliffe, L. (2008). *Mycoplasma Diseases of Ruminants*. Wallingford, UK: CABI.
- Nicholas, R., Bashiruddin, J., Ayling, R. ve Miles, R. (2000). Contagious bovine pleuropneumonia: a review of recent developments. *Vet. Bull*, 70, 827-838.
- OIE (2013a). *Contagious Bovine Pleuropneumonia*. Erişim: 11.01.2014, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013, World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.09_CBPP.pdf
- OIE (2013b). *Contagious Bovine Pleuropneumonia*. Erişim: 11.01.2014, Technical Disease Cards, World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/CONTAGIOUS_BOVINE_PLEUROPNEUMONIA_FINAL.pdf
- OIE (2013c). *Chapter 11.8. Infection with Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC (Contagious bovine pleuropneumonia)*. Erişim: 11.01.2014, Terrestrial Animal Health Code (2013), World Organisation for Animal Health: http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_1.11.8.htm
- OIE (2014). *OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2014*. Erişim: 25.07.2014, World Organisation for Animal Health: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>
- Önat, K. (2011). Sığır Pnömonilerinde *Mycoplasma bovis* Varlığının Kültür ve ELISA Yöntemleri ile Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. Bursa

- Özdamar, K. (1999). *SPSS ile Biyoistatistik* (3. baskı). Eskişehir: Kaan Kitabevi.
- Özdemir, U. ve Türkyılmaz, M.A. (2008). Buzağılarda önemli pneumoni etkenlerinden *Mycoplasma bovis*'in izolasyonu ve identifikasyonu. İçinde *VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Van, 7-9 Ekim 2008.
- Özdemir, U., Evans, D., Türkyılmaz, M.A., Ateşoğlu, A. ve Nicholas, R.A.J. (2009). Isolation of *Mycoplasma bovis* and other Respiratory Disease Pathogens from acute and chronic pneumonic lung samples in a calf rearing unit in Turkey. İçinde *Mycoplasmology - a review of developments over the last decade Gran Canaria, Canary Islands, Spain*, 10 -12th June 2009.
- Özen, H., Karaman, M., Şahin, M. ve Özcan, K. (2009). Pnömonili Sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. Bovirhinis* ve *M. mycoides* subsp. *mycoides* (küçük koloni tipi)'in PZR ile Belirlenerek Patolojik Bulguların İncelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(1), 125.
- Pfutzner, H. (1990). Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt für Bakteriologie: Supplement*.
- Pfütznar, H. ve Sachse, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), 1477-1494.
- Pitcher, D. G. ve Nicholas, R. A. J. (2005). *Mycoplasma* host specificity: fact or fiction?. *The Veterinary Journal*, 170(3), 300-306.
- Provost, A., Perreau, P., Breard, A., Le Goff, C., Martel, J. L. ve Cottew, G. S. (1987). Contagious bovine pleuropneumonia. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE (France)*. 6(3), 625-679.
- Punyapornwithaya, V., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. ve Alldredge, J. R. (2010). Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: A case study from Idaho, USA. *Preventive veterinary medicine*, 93(1), 66-70.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.S., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S. ve Hartigan, P.J. (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2nd ed.). West Sussex: Blackwell.
- Radaelli, E., Luini, M., Loria, G. R., Nicholas, R. A. J. ve Scanziani, E. (2008). Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of

- Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Research in veterinary science*, 85(2), 282-290.
- Radostits, O., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. ve Constable, P.D. (2007). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats, and Horses* (10th ed.). New York: Elsevier Saunders.
- Razin, S. ve Herrmann, R. (2002). *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Razin, S. ve Tully, JG. (1995). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (Vol. 1). San Diego, California: Academic Press.
- Regalla, J., Caporale, V., Giovannini, A., Santini, F., Martel, J. L. ve Gonçalves, A. P. (1996). Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), 1309-1329.
- Robino, P., Alberti, A., Pittau, M., Chessa, B., Miciletta, M., Nebbia, P. ve Rosati, S. (2005). Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary microbiology*, 109(3), 201-209.
- Sachse, K., Salam, H. S., Diller, R., Schubert, E., Hoffmann, B. ve Hotzel, H. (2010). Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *The Veterinary Journal*, 186(3), 299-303.
- Scanziani, E., Paltrinieri, S., Boldini, M., Grieco, V., Monaci, C., Giusti, A. M. ve Mandelli, G. (1997). Histological and immunohistochemical findings in thoracic lymph nodes of cattle with contagious bovine pleuropneumonia. *Journal of comparative pathology*, 117(2), 127-136.
- Schnee, C., Schulsse, S., Hotzel, H., Ayling, R. D., Nicholas, R. A., Schubert, E. ve Sachse, K. (2012). A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 *Mycoplasma* species and highlights multiple *Mycoplasma* infections. *PloS one*, 7(3), e33237.
- Spickler, A.R., Roth, J.A., Galyon, J. ve Lofstedt, J. (2010). *Emerging and Exotic Diseases of Animals* (4th ed.). Ames, Iowa: Iowa State University College of Veterinary Medicine.
- Stipkovits, L., Glavits, R., Ripley, P., Molnar, T., Tenk, M. ve Szeredi, L. (2000). Pathological and immunohistochemical studies of pneumonia in calves

- experimentally induced by *Mycoplasma bovis*. İçinde D. Bergonier, X. Berthelot, J. Frey (Ed.) *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*. Brussels: European Commission; 27-30.
- Stipkovits, L., Rady, M. ve Glavits, R. (1992). Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. *Acta veterinaria Hungarica*, 41(1-2), 73-88.
- Tambi, N. E., Maina, W. O. ve Ndi, C. (2006). An estimation of the economic impact of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 25(3), 999-1011.
- Tardy, F., Gaurivaud, P., Tricot, A., Maigre, L. ve Poumarat, F. (2009). Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the '*Mycoplasma mycoides*' cluster: is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable?. *Letters in applied microbiology*, 48(2), 210-217.
- Ter Laak, E. A. (1992). Contagious bovine pleuropneumonia a review. *Veterinary Quarterly*, 14(3), 104-110.
- Thiaucourt, F., Lorenzon, S., David, A. ve Breard, A. (2000). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Veterinary microbiology*, 72(3), 251-268.
- Thomas, A., Ball, H., Dizier, I., Trolin, A., Bell, C., Mainil, J. ve Linden, A. (2002a). Isolation of mycoplasma species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *The Veterinary Record*, 151(16), 472-476.
- Thomas, A., Dizier, I., Trolin, A., Mainil, J. ve Linden, A. (2002b). Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary research communications*, 26(5), 333-339.
- Thomas, L. H., Howard, C. J., Stott, E. J. ve Parsons, K. R. (1986). *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. *Veterinary Pathology Online*, 23(5), 571-578.
- Tully, J.G. ve Razin, S. (1996). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (Vol. 2). San Diego, California: Academic Press.
- Tully, J.G. ve Whitcomb, R.F. (1979). *The Mycoplasmas: Human and Animal Mycoplasmas* (Vol. 2). New York: Academic Press.

- Ülgen, M., Özbilgin, S., Kahraman, M.M. ve Özmen, Ö. (1996) Bursa Yenişehir’de danalarda görülen bulaşıcı pneumoni salgını üzerinde bakteriyolojik ve patolojik incelemeler. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 8(3), 134-140.
- Vogl, G., Plaickner, A., Szathmary, S., Stipkovits, L., Rosengarten, R. ve Szostak, M. P. (2008). *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infection and immunity*, 76(1), 71-77.
- Walker, J.M. ve Rapley, R. (2005). *Medical Biometrics Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.
- White, B. J., Hanzlicek, G., Sanderson, M. W., Anderson, D. E. ve Larson, R. L. (2010). Mollicutes species and *Mycoplasma bovis* prevalence and association with health outcomes in beef feeder calves at arrival and initial treatment for bovine respiratory disease. *The Canadian Veterinary Journal*, 51(9), 1016.
- Whitford, H.W., Rosenbusch, R.F. ve Lauerma, L.H. (1999). *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Woldehiwet, Z., Mamache, B. ve Rowan, T. G. (1990). Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by *Mycoplasma* spp. *British Veterinary Journal*, 146(5), 419-424.
- Xin, J. Q., Gao, Y. L., Li, Y., Wang, Y. F. ve Qian, A. D. (2007). Development of an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Seromonitoring Contagious Bovine Pleuropneumonia Using Recombinant Lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC as Antigen. *Agricultural Sciences in China*, 6(1), 100-107.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2011/ 121

29/09 / 2011

Sn: Prof. Dr. A.Atilla ILGAZ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No :2011/ 121
Başvuru :23.09.2011

Sorumluluğunu Üstlendiğiniz Veteriner Hekim Mehmet Ali TÜRKYILMAZ'a ait
“Pnömonili Sığır Akciğerlerinden Mycoplasma’ların İzolasyonu ve 16S rDNA PCR ve
DGGE İle İdentifikasyonu” isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul
ilkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYЕК Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Yard.Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mehmet Ali	Soyadı	Türkyılmaz
Doğ.Yeri	Sütçüler	Doğ.Tar.	24.11.1980
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	17324258024
Email	maliturkyilmaz@gmail.com	Tel	0530 326 13 67

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2003
Lisans		
Lise	Ankara Laborant Meslek Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Veteriner Hekim	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	2003-halen
2.	Laborant	Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü	1998-2003
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	79	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	57,147	59,159	61,170
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlara:

Ozdemir, U., Turkyilmaz, M.A. (2005): Microbiological and serological studies on strains of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* isolated from the outbreaks

of contagious caprine pleuropneumonia. The Journal of Pendik Veterinary Microbiology. 36(1-2) 47-51

Ozdemir, U., Churward, C., Turkyilmaz, M.A. and Nicholas, R.A.J. (2006): Contagious caprine pleuropneumonia: a New Disease Threat to Europe. IOM 16th International Congress, 9-14 July, Cambridge, UK.

Ateşoğlu, A., Alp, H.G., Tunç, S., Baklan, A. ve Türkyılmaz, M.A. (2006): Yavru Alabalık ölümlerinde bakteriyel ve paraziter etkenlerin rolü. VII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 27-28 Eylül, Side, Antalya, Türkiye.

Ozdemir, U., Turkyilmaz, M.A., Nicholas, R.A.J. (2007): Contagious Caprine Pleuropneumonia (CCPP) in Turkey and New Outbreaks in Thrace. 15th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, 15-19 May, Kusadasi, Turkey.

Özdemir, Ü. ve Türkyılmaz, M.A. (2008): Buzağılarda önemli pnömoni etkenlerinden *Mycoplasma bovis*'in izolasyonu ve idenifikasyonu. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 7-9 Ekim, Van, Türkiye.

Dakman, A., Günaydın, E., Türkyılmaz, M.A., Güleç, M., Coşar, M., Özdemir, Ü. (2009): *Mycoplasma* infections detected in breeder holdings. The Journal of Etlik Veterinary Microbiology. 20(1-2) 27-34.

Ozdemir, U., Evans, D., Turkyilmaz, M.A., Atesoglu, A. and Nicholas, R.A.J. (2009): Isolation of *Mycoplasma bovis* and other respiratory disease pathogens from acute and chronic pneumonic lung samples in a calf rearing unit in Turkey. The Congress of Mycoplasma: A Review of Developments Over the Last Decade, 10-12th June, Gran Canaria, Canary Islands, Spain.

Manso-Silván, L., Dupuy, V., Peyraud, A., Lysnyansky, I., Ozdemir, U., Turkyilmaz, M.A. and Thiaucourt, F. (2010): Multi-locus sequence typing for phylogeny and fine typing of *Mycoplasma agalactiae* strains. 18th meeting of the International Organization for Mycoplasma, 11-16th July, Chianciano Terme, Siena, Italy.

Sertifikalar:

“The Diagnosis of Infections Caused by *Mycoplasmas* Using Classical Techniques and PCR” Pendik Veterinary Control and Research Institute, Istanbul (5 gün).

“EN ISO/IEC 17025:2000, Accreditation of Laboratories” Pendik Veterinary Control and Research Institute, Istanbul (2 gün).

“Epidemiology and diagnosis of CBPP, CCPP and CA” Friedrich Loeffler Institute, Jena, Germany (28 gün).

“Molecular Diagnostic Tools” Pendik Veterinary Control and Research Institute, Istanbul, (European Inco-Dev Project on “Evaluation and Improvement of Integrated Livestock Disease Control Measures through Distribution of Molecular Diagnostic Tools, Evaluation of Disease Situation, Training and Capacity Building in Asia”), (5 gün).

“Good Laboratory Practice” Pendik Veterinary Control and Research Institute, Istanbul, (Turkey - Slovakia Twinning Project TR/2004/IB/EC/06), (10 iş günü).

“Good Laboratory Practice for Principle Investigators” Refik Saydam Hygiene Center, Ankara, (Turkey - Slovakia Twinning Project TR/2004/IB/EC/06), (10 iş günü).

“Regional Training Course on Rapid Diagnosis of Avian Influenza”Federal Centre for Animal Health, Vladimir, the Russian Federation, (Joint FAO/IAEA Programme; ConFluTech), (10 iş günü).

“TS EN ISO 19011 Guidelines for auditing management systems”, Gıda Güvenliği ve Hijyeni Akademisi, İstanbul, (2 gün).

“Use of experimental animals” Pendik Veterinary Control Institute, Istanbul, (10 gün).

“Veterinary medicinal products” Research Center Borstel, Germany, (6 ay).

Özel İlgi Alanları (Hobileri):